



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

ESTUDI COMPARATIU DE DETECCIÓ DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMÀ ENTRE PELL PSORIÀSICA I PELL NORMAL

Elisabet Dilmé Carreras
Hospital Universitari Sagrat Cor

Director: Dr. Ramón M^a Pujol Vallverdú.

Co-Director: Dr. Pablo Umbert Millet.

2010 (convocatòria setembre)

Agraïments:

Donar les gràcies a la família pel suport i ànims que m'han donat durant la realització del treball de recerca.

Agraïr de forma especial al Gerard totes les hores gastades en ajudar-me a comprendre la base de les tècniques de biologia molecular.

I sobretot, mencionar a la Dra. Joe Ellen Klaustermeier de l'Institut Català d'Oncologia de Bellvitge, que m'ha ensenyat i ha dut a terme el procés de detecció del Virus del papiloma humà de les nostres mostres, principal objectiu d'aquest estudi. Sense ella, no hagués estat possible la realització d'aquesta tesina.

No oblidar els companys del Servei de Dermatologia del meu hospital que m'han ajudat en el procés de selecció dels pacients i a l'estructuració del treball d'investigació.

I com no, donar les gràcies al Director i Co-Director d'aquest estudi per haver-me dedicat part del seu temps.

ÍNDEX

Índex	i
Llista d'abreviatures	iii
Resum	v
1. Introducció	1
1.1 Psoriasi	1
1.1.1 Concepte	1
1.1.2 Epidemiologia	1
1.1.3 Etiologia	2
1.1.3.1 Genètica	2
1.1.3.2 Immunopatogenia	3
1.1.3.3 Factors ambientals desencadenants	4
1.1.4 Clínica	5
1.1.5 Histopatologia	10
1.1.6 Índex de gravetat i qualitat de vida	11
1.1.7 Pronòstic	13
1.1.8 Diagnòstic	13
1.1.9 Tractament	14
1.2 Virus del papiloma humà (VPH)	18
1.2.1 Concepte	18
1.2.2 Estructura i classificació	19
1.2.3 Malalties	21
1.2.4 Mètodes de detecció	22
1.3 Relació entre el Virus del papiloma humà i la psoriasi	24
2. Objectius	31
2.1. Justificació de l'estudi d'investigació	31
2.2. Hipòtesi	31
2.3. Objectius	32

3. Material i mètodes	33
3.1. Àmbit	33
3.2. Tipus d'estudi	33
3.3. Període d'estudi	33
3.4. Mostra	33
3.5. Càlcul del tamany mostral	34
3.6. Procediment	35
3.6.1. Extracció de la mostra de pell	35
3.6.2. Extracció de l'ADN	35
3.6.3. Detecció de Virus del papiloma humà	38
3.6.3.1. Disseny de <i>primers</i> consens	38
3.6.3.2. Disseny de <i>primers</i> específics	39
3.6.3.3. Amplificació de l'ADN de VPH per mitjà de <i>primers</i> consens	39
3.6.3.4. Tipatge amb Reverse Line Blot (RLB)	40
3.6.3.5. Sensibilitat i especificitat del RLB	42
3.6.3.6. Reproductibilitat del RLB	43
3.7. Variables principals de l'estudi	43
3.7.1. Variables dependents	43
3.7.2. Variables independents	43
3.8. Recollida de dades	43
3.9. Anàlisi estadístic	43
4. Resultats	45
4.1. Estudi descriptiu de la mostra estudiada	45
4.2. Estudi de la qualitat de l'ADN extret de les biòpsies cutànies	45
4.3. Estudi del tipatge de VPH per mitjà de Reverse Line Blot	45
4.4. Anàlisi estadístic dels resultats	46
5. Discussió	49
6. Conclusions	55
7. Bibliografia	57

LLISTA D'ABREVIATURES

µL: Microlitre.
µm: Micròmetre.
8-MOP: 8-metoxipsoralé.
ADN: Àcid desoxiribonucleic.
AINE: Antiinflamatoris no esteroïdals.
ARN: Àcid ribonucleic.
ARNm: Àcid ribonucleic missatge.
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.
BPV: *Bovine Papillomavirus*/Papilomavirus boví.
CIN: *Cervical intraepithelial neoplasia*/Neoplàsia cervical intraepitelial.
CRPV: *Cottontail rabbit papilloma virus*/ Papilomavirus del conill de cua de cotó.
CsCl: Clorur de Cesi.
DB: *Dot Blot*.
DDC: *Dermal dendritic cell*/ Cèl·lula dendrítica dèrmica.
DLQI: *Dermatology Life Quality Index*/Índex de Qualitat de Vida en Dermatologia.
E6: Proteïna E6 del Virus del papiloma humà.
E7: Proteïna E7 del Virus del papiloma humà.
EDAC: *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*.
EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*/Àcid etilendiaminotetraacètic.
ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay/Assaig per InmunoAdsorció lligat a Enzims.
Fab: Fragment antigen binding/Fracció d'unió a l'anticòs.
Fc: Fragment crystallizable/Fracció constant.
Fig: Figura.
H₁: Hipòtesi alternativa.
HC: Hybrid capture/Captura d'híbrid.
HLA: *Human leucocyte antigen*/Antigen leucocitari humà.
H₀: Hipòtesi nul·la.
IC: Interval de confiança.
IECA: Inhibidor de l'enzim conversor de l'angiotensina.
IFN γ : Interferó gamma.
IL: Interleucina.
ISH: *In Situ Hybridation*/Hibridació in situ.
Kb: kilobase.
KC: *keratinocyte*/queratinòcit.
Kg: kilogram.
KGF: *Keratinocyte growth factor*/Factor de creixement del queratinòcit.
L1: Proteïna major de la càpside del Virus del papiloma humà.
LTh1: Limfòcit T-helper o col·laborador1.
LTh17: Limfòcit T-helper o col·laborador17
LTh2: Limfòcit T-helper o col·laborador2.
mg: Mil·ligram.
min: Minut.
ml: Mililitre.
mm: Mil·límetre.
mM: Milimolar.
NaHCO₃: Carbonat de sodi.
Nm: Nanòmetre.

°C: Graus centrigads.
OD: Odds Ratio.
ORF: *Open reading frame*/Fragment de lectura oberta.
PASI: *Psoriasis Area and Severity Index*/Índex de Severitat i Àrea de Psoriasi.
pb: Parells de bases.
PCR: *Polymerase Chain Reaction*/ Reacció en cadena de la polimerasa.
PDC: *Plasmacytoid dendritic cell*/Cèl·lula dendrítica plasmocitoide.
pmol: Picomols.
PUVA: Psoralé + Ultravioleta tipus A.
RIA: *RadiolImmunoAssay*/RadiolInmuoAssaig.
RLB: *Reverse Line Blot*.
SB: *Southern Blot*.
SDS: *Sodium dodecyl sulfat*.
seg: Segon.
SSPE: *Saline-Sodium Phosphate-EDTA*.
SV40: *Simian Virus 40*/Virus del Simi 40.
TAE: Tris-acetat-EDTA.
Taq polimerasa: Polimerasa d'ADN de *Thermus aquaticus*.
TNF α : *Tumor necrosis factor-alpha*/Factor de necrosis tumoral-alfa.
UV: Ultravioleta.
UVA: Ultravioleta tipus A.
UVB: Ultravioleta tipus B.
VEGF: *Vascular endothelial growth factor*/Factor de creixement vascular endotelial.
VPH: Virus del papiloma humà.
VSG: Velocitat de sedimentació globular.

RESUM

Existeix un debat continu pel que fa a la prevalença i rellevància del Virus del papiloma humà (VPH) en l'etiopatogènia de la psoriasi.

S'ha descrit en nombrosos articles una elevat percentatge de detecció de beta-papilomavirus en pacients amb psoriasi, sobretot el VPH5 i el 36, suggerint que aquests virus podrien correspondre a l'antigen causal de la cascada immunològica que es produeix en aquesta dermatosi.

Les diferències entre les mostres analitzades i els mètodes usats per la detecció papilomavirus en els estudis aportats a la bibliografia fa que sigui difícil comparar les dades directament.

El propòsit del present estudi és utilitzar un mètode ampli i imparcial pel que fa a la detecció d'ADN del VPH. Avaluarem si els papilomavirus beta i també el gamma es troben de forma més freqüent en pell psoriàsica en comparació amb pell sana, i quins són els VPH específics que estan més sobreexpressats.

Per aconseguir-ho extraurem l'ADN de les biòpsies cutànies de 30 pacients amb psoriasi i de 30 subjectes sans. Realitzarem una PCR amb *primers* consens per a la detecció de 24 tipus de beta i gamma-papilomavirus i posteriorment utilitzarem la tècnica del Reverse Line Blot pel tipatge de VPH específic.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 PSORIASI

1.1.1 CONCEPTE

La psoriasi és una dermatosi inflamatòria crònica, recidivant i mediada immunològicament per limfòcits T que té un efecte negatiu significatiu sobre el benestar físic i emocional dels pacients. S'engloba dins del grup de les malalties eritemato-descamatives, i afecta pell, cabell, ungles, mucoses i articulacions.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Tot i que la psoriasi té una distribució universal mostra una prevalença variable en funció del país i, fins i tot, en funció de l'àrea geogràfica estudiada dins d'un mateix país.

La prevalença més elevada es dona a la població blanca originària d'Escandinàvia i el nord d'Europa, amb xifres compreses entre el 3,5% al Sud d'Alemanya, el 2,8% a les illes Faroe i el 2% de la població general dels Estats Units (Gudjonsson and Elder 2007).

A Espanya observem una prevalença del 1,4% de la població (Ferrándiz, Pujol et al. 2002) que es tradueix en aproximadament unes 560.000 persones afectades de psoriasi.

Al contrari, en països de l'est Africà, Amèrica Central, India i China, la incidència és molt baixa, en torn del 0,5% aproximadament (Christophers 2001).

No existeixen diferències de prevalença, ni clíniques, entre ambdós sexes.

La determinació exacta de l'edat d'inici a partir de l'anamnesi és problemàtica, però en diversos estudis s'ha identificat una presentació bimodal, amb un primer pic entre els 15-20 anys i un segon pic entre els 55-60 anys (Burch and Rowell 1981; Smith, Kassab et al. 1993). Henseler i Christophers (Henseler and Christophers 1985) van identificar dos tipus clínics de psoriasi: en els pacients amb psoriasi tipus I (el més freqüent amb afectació del 75% dels casos) la malaltia s'inicia abans dels 40 anys, tendeix a ser més greu i amb un major component genètic, associant-se en un 85% dels casos a l'al·lel HLA-Cw6, en comparació amb l'associació del 15% en els pacients amb psoriasi d'inici tardà o tipus II.

1.1.3 ETIOLOGIA

1.1.3.1 Genètica

Els estudis de població indiquen que la malaltia tendeix a agrupar-se per famílies, s'ha observat que un 30% dels pacients amb psoriasi tenen un familiar de 1er grau també afectat. Quan els pares i un germà tenen psoriasi, la probabilitat de que un recent nascut desenvolupi psoriasi és del 50%; quan els pares estan afectats, la probabilitat és d'un 41%; quan un sol progenitor està afectat, d'un 14%, mentre que si només està afectat un germà, el risc baixa al 6% (la probabilitat de desenvolupar una psoriasi en persones sense antecedents familiars és d'aproximadament un 2%) (Andressen and Henseler 1982). Els estudis de bessons també recolzen el component genètic: el risc de concordança per la malaltia és 2-3 vegades superior en bessons homozigots que en heterozigots (Farber, Nall et al. 1974). Probablement existeix una variabilitat genètica de la malaltia, en algunes famílies podria heredar-se de forma mendeliana (autosòmica dominant i recessiva) tractant-se d'una malaltia monogènica, mentre que en la majoria dels casos es produiria com a resultat de la interacció de múltiples gens amb factors ambientals (Griffiths and Barker 2007).

S'han efectuat diversos estudis genòmics en famílies extenses identificant-se almenys 9 loci amb lligament genètic significatiu amb la psoriasi, que es denominen PSORS1-9 (Liu, Krueger et al. 2007). Fins un 35-50% del component genètic de la psoriasi podria atribuir-se a PSORS1, localitzat en 6p21.3, la regió del cromosoma 6 que codifica el complex major d'histocompatibilitat (Allen, Ameen et al. 2005; Nair, Stuart et al. 2006); encara que no s'han identificat mutacions específiques, ja s'ha comentat la intensa associació de l'al·lel HLA-Cw6, en especial amb la psoriasi de tipus I. PSORS2 (17q24-25), PSORS5 (3q21) i PSORS9 (4q28-31) són altres loci l'associació dels quals també ha estat descrita (Capon, Trembath et al. 2004). PSORS4 es localitza en el complex de diferenciació epidèrmica (1q.21.3), el qual conté molts gens l'expressió dels quals augmenta de forma coordinada en la psoriasi.

Els estudis de lligament familiar també han demostrat l'associació amb diversos loci que també s'han descrit associats a la dermatitis atòpica, la qual cosa planteja la possibilitat de que corresponguin a gens específics de la inflamació cutània.

Alguns d'aquests loci podrien explicar l'associació amb altres malalties patogènica relacionades, com succeeix amb PSORS8 (16q12-q13), que conté un gen de susceptibilitat

conegut (CARD15) per la malaltia de Chron, però no per la psoriasis (Jenish, Hampe et al. 2006).

També s'han efectuat estudis que suggereixen que algunes variants fenotípiques de la psoriasi podrien tenir un substrat genètic diferent: la psoriasi guttata eruptiva s'associa amb PSORS1, a diferència de la psoriasi palmoplantar i la psoriasi vulgar de tipus II.

1.1.3.2 Immunopatogenia

Tot i que encara no es coneix amb exactitud la causa de la psoriasi, sí que es pot afirmar que es tracta d'una malaltia de caràcter immunològic, fins i tot autoimmune, que apareix en subjectes amb una base genètica especial i que es veu afavorida per una sèrie de factors desencadenants.

Per analogia amb el que es coneix sobre els limfòcits T en la hipersensibilitat cutània retardada (dermatitis de contacte), existiria una primera fase de sensibilització, on les cèl·lules presentadores d'antigen (cèl·lules de Langerhans epidèrmiques i cèl·lules dendrítiques dèrmiques) migrarien als ganglis limfàtics per presentar l'hipotètic antigen (d'origen estreptocòcic en alguns casos, en altres probablement un autoantigen) als limfòcits T, donant lloc a una petita població sensibilitzada que migraria a la pell (sense donar manifestacions clíniques: fase silent o latent), on eventualment serien reactivats (fase de provocació o efectora) i produirien citoquines que determinarien les alteracions de la diferenciació i la proliferació dels queratinòcits i els canvis inflamatoris, amb fluxe de diversos tipus cel·lulars i alteracions vasculars que caracteritzen a la lesió de psoriasi establerta, així com a un microambient d'òrgan limfoide secundari que permetria una posterior activació in situ mitjançant la interacció amb cèl·lules dendrítiques presents a les lesions cutànies.

Per què es produeixi l'activació funcional dels limfòcits T (en el gangli o en la pròpia pell) es requereixen de tres senyals. La primera ve determinada per la presentació de l'antigen combinat amb una molècula del complex major d'histocompatibilitat II a la superfície de la cèl·lula dendrítica al receptor de la cèl·lula T. La segona senyal es produeix per la interacció de les molècules coestimuladores de les cèl·lules dendrítiques amb els seus corresponents lligands en el limfòcit T. La tercera senyal ve determinada per les citoquines predominants en el medi en el moment de l'activació. Segons quines siguin es produeixen diferents tipus de limfòcits T amb diferents capacitats funcionals i possibilitats d'interregulació a través de les citoquines que cada un d'aquests tipus produeix de forma

preferencial. La IL-4 indueix la polarització a Th2 i inhibeix el desenvolupament de Th1 i Th17, mentre que la IL-2 i l'INF γ indueix la polarització a Th1 i inhibeix el desenvolupament de cèl·lules Th2 i Th17.

Durant l'última dècada del segle XX i els primers anys del segle XXI, es considerava que a la psoriasi predominaven els limfòcits Th1, els quals produeixen INF γ , TNF α i IL-22. Però avui en dia es considera que els limfòcits Th17 amb producció predominant de IL-6, IL-17 i IL-22 tenen un paper molt important en la patogènia de la psoriasi, com prova l'eficàcia terapèutica del bloqueig de la seva diferenciació per mitjà d'anticossos dirigits contra la subunitat p40 (Krueger 2007).

Les IL finals secretades pels limfòcits Th17 i Th1 induïrien una activació dels queratinòcits i la proliferació epidèrmica conduint a la formació de la placa psoriàsica.

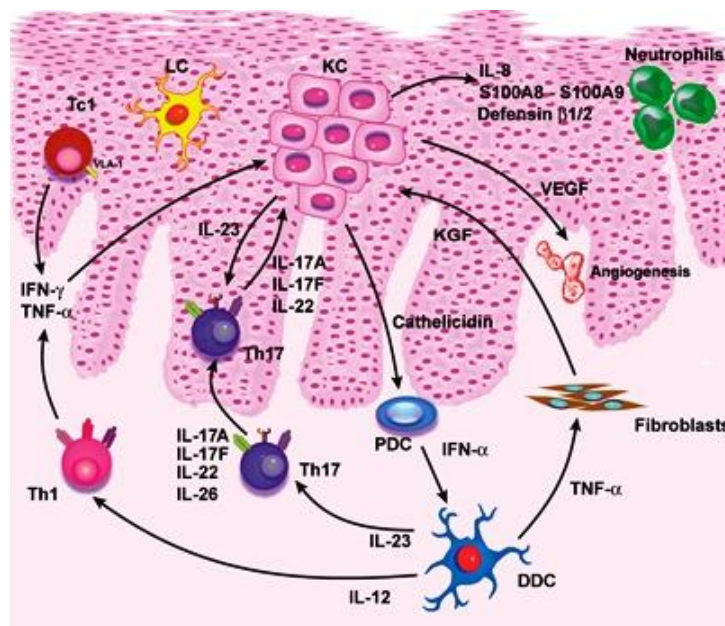


Fig 1. Concepte actual de la immunopatogènia de la fase efectora de la psoriasi. KC: queratinòcits, IL: Interleucina, DDC: Cèl·lules dendrítiques, KGF: factor de creixement dels queratinòcits, PDC: Cèl·lules dendrítiques plasmocitoides, VEGF: factor de creixement vascular endotelial, IFN γ : Interferó-gamma, TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, Th: Limfòcit T col·laborador (Di Cesare and Di Meglio et al. 2009).

1.1.3.3 Factors ambientals desencadenants

En un estudi realitzat amb una mostra de 870 pacients psoriàsics (Park and Youn 1998) es va observar que els factors ambientals més freqüentment associats a l'empitjorament clínic d'aquesta dermatosi eren l'estrés i el fred, i els factors més freqüentment associats a la millora clínica eren l'estiu, la radiació ultravioleta i l'embaràs.

Actualment es consideren els següents factors agreujants de la psoriasi:

1. Estrés: aquest correspon a l'agreujant més freqüent.
2. Fàrmacs: existeixen certs fàrmacs que poden desencadenar i/o empitjorar la malaltia com els antiinflamatoris no esteroïdals (AINE), el liti, els antipalúdics, els betabloquejants, i els inhibidors de l'enzima conversora de l'angiotensina (IECA). Per altra banda, alguns fàrmacs utilitzats en el tractament de la psoriasi poden interaccionar amb fàrmacs d'ús habitual, per la qual cosa és important conèixer la medicació habitual de cada pacient.
3. Traumatismes: els traumes tant en pell afectada com en pell sana poden afavorir l'aparició de psoriasi a causa del fenomen de Koebner. Cal educar el pacient perquè eviti el rascat o manipulació de les lesions.
4. Hormonals: és comú l'empitjorament de la dermatosi a la dona a la setmana premenstrual, així com la milloria o l'estabilització durant l'embaràs.
5. Obesitat: el sobrepès s'ha relacionat amb formes més greus de psoriasi.
6. Tòxics: el consum de tabac s'ha relacionat amb un major risc de patir la malaltia. Pel que fa a l'alcohol s'ha observat un consum més freqüent del mateix en pacients amb psoriasi (això reflexa més la càrrega psicològica de la malaltia que la seva actuació com a factor agreujant) (Poikolainen, Reunala et al. 1990; Poikolainen, Reunala et al. 1994).
7. Clima: s'ha observat un agreujament de la psoriasi durant la tardor i la primavera i una millora durant l'estiu. La radiació solar provoca una clara millora amb blanquejament de les lesions tot i que s'ha descrit un empitjorament en el 8% dels casos (Park and Youn 1998).
8. Infeccions: les infeccions per *Streptococcus pyogenes* desencadenen la malaltia en nens i adults joves (Telfer, Chalmers et al. 1992), sobretot el subtipus de psoriasi guttata. S'ha observat una freqüència deu vegades superior

d'amigdalitis estreptocòcica en pacients amb psoriasi guttata que en la població general.

1.1.4 CLÍNICA

La lesió elemental de la psoriasi és una pàpula rosada o vermella, coberta per una escama blanquinosa que pot ser de major o menor gruix en funció de la localització o dels tractaments realitzats. Si tota la placa està coberta d'escames, el component eritematós pot passar inadvertit.

Una maniobra clàssica a l'exploració de la placa de psoriasi és el raspat metòdic de Brocq. Es realitza amb una cullereta metàl·lica sobre una placa de psoriasi sense tractar. En els primers cops de cullereta es desprenen escames, pulverulentes, de color blanquinós (signe de la taca de cera). Si prosseguim, apareix una membrana brillant (membrana de Duncan-Buckley) que manifesta l'epiteli desprovis de capa còrnia. Amb un cop de cullereta major es desprèn la membrana i apareix un puntejat hemorràgic (signe de la rosada sagnant d'Auspitz) ocasionat per les nanses capil·lars dilatades de les papi-les dèrmiques denudades per la cullereta.

El tamany i morfologia de les plaques de psoriasi varia molt d'un pacient a un altre. Es distingeixen lesions "guttata", "punctata", nummulars, petites o grans plaques, lineals, anul·lars o circinades, arciformes, zoniformes o universals.

Les plaques de psoriasi poden localitzar-se a qualsevol lloc de la superfície cutània. Tenen tendència a la simetria i a localitzar-se preferentment a les cares d'extensió de les extremitats, sobretot colzes i genolls, regió lumbosacra i cuir pilós. En alguns pacients tendeixen a localitzar-se en àrees seboreiques la qual cosa es coneix amb el terme de *sebopsoriasi*.

Existeixen diverses formes clíniques depenent de la morfologia de les lesions, la localització i els símptomes:

1. **Psoriasi vulgar o en plaques:** és la forma més freqüent de la malaltia, i es presenta en el 65-70% del total de casos de psoriasi. Es caracteritza per la presència de plaques eritemato-descamatives sobreelevades, ovalades i ben circumscrites, amb una escama de color gris-platejat. Les lesions solen ser simètriques i afecten principalment a la cara extensora de les extremitats (colzes, genolls), regió lumbo-

sacre, cuir pilós, regió retroauricular i melic, però pot trobar-se en qualsevol altre localització.

2. **Psoriasi guttata o en gotes:** representa aproximadament un 2% del total de casos de psoriasi, i es caracteritza per l'inici agut eruptiu de multitud (entre desenes i centenars) de pàpules de psoriasi de diàmetre comprés entre 2 i 10 mil·límetres; l'inici agut de la malaltia permet distingir-la de la variant en placa petita de la psoriasi vulgar. Tendeix a presentar una distribució de predomini troncal, i sovint es presenta dies o setmanes després d'una infecció, generalment faringoamigdal·lar, per estreptococ betahemolític. Pot ser la forma de presentació tant en nens com en adults joves, si bé en els primers tendeix a ser autolimitada, en els adults els brots de psoriasi guttata acostumen a sobreposar-se a una psoriasi en plaques crònica. Es considera que aproximadament 1 de cada 3 pacients amb psoriasi guttata aguda eventualment desenvoluparà una psoriasi en placa crònica.
3. **Psoriasi invertida o flexural:** és una forma de psoriasi que afecta els plecs cutanis (en especial la regió inframamària, les axil·les, els engonals, i la regió perineal). La maceració dóna lloc a l'absència d'escames i les lesions tenen un aspecte característic en forma de màcules o plaques vermelles brillants i ben delimitades.
4. **Psoriasi pustulosa:** és una forma poc freqüent de la malaltia, on observem múltiples pústules estèrils de tamany entre 2 i 5mm, sobre una base eritematosa. Pot aparèixer en pacients amb psoriasi coneguda o aparèixer *de novo*, especialment quan afecta a palmells i plantes. Existeixen varies formes de psoriasi pustulosa:
 - Psoriasi pustulosa generalitzada o de Von Zumbusch: es dóna en pacients amb lesions de psoriasi vulgar preexistent. Amb freqüència s'identifica un factor desencadenant: irritació per tractaments tòpics (brees, ditranol), sistèmics (salicilats, iodurs, AINE, liti, etc) o després de la suspensió de corticoides sistèmics o corticoides tòpics d'alta potència. En aquests pacients la pell esdevé molt eritematosa amb àrees extenses d'edema. Durant les següents hores apareixen pústules que augmenten de tamany, conflueixen i donen lloc a plaques pustuloses. La psoriasis de Von Zumbusch sol cursar amb afectació sistèmica important (leucocitosi, limfopènia, augment de la VSG, hipoalbuminèmia, hipocalcèmia), i pot donar a lloc a diverses complicacions: icterícia, trombosis venosa profunda, infecció estafilocòcica, oligúria, etc (Baker and Ryan 1968).

- Psoriasi pustulosa generalitzada de l'embaràs: també coneguda com impetigen herpetiforme. És una entitat molt rara que debuta a l'últim trimestre de l'embaràs. Les pacients solen tenir història personal o familiar de psoriasi. Clínicament es presenta com una psoriasi pustulosa generalitzada que s'inicia en els plecs. Hi ha recurrències en cada embaràs. Pot comprometre la vida de la mare i la del fetus. Analíticament és característic el descens dels nivells de la vitamina D.
 - Psoriasi pustulosa localitzada o palmoplantar: és més freqüent en dones a la sisena dècada de la vida. Es presenta com una o més plaques simètriques, compostes per múltiples pústules, a nivell del palmell de les mans (sobretot a l'eminència tenar) i en els peus (en el taló i en els marges laterals). Les lesions són resistents als tractaments i presenten un curs prolongat. Amb freqüència s'associa a hipotiroïdisme o hipertiroïdisme, diabetis mellitus i artropaties. Quan la psoriasi pustulosa afecta únicament als dits es coneix com a acrodermatitis contínua supurativa de Hallopeau. Les lesions poden ser doloroses i invalidants amb deformitats secundàries a la ungla i a l'ós.
 - Psoriasi pustulosa anular o circinada de Lapière-Milian: constitueix un tipus de psoriasi pustulosa subaguda caracteritzada per lesions pustuloses de morfologia anular.
5. **Psoriasi eritrodèrmica**: és la forma menys freqüent. Es caracteritza per l'afectació de pràcticament tota la superfície corporal i presenta les possibles complicacions pròpies de l'eritrodèrmia, secundàries a l'afectació de la termoregulació, la funció cardiovascular (insuficiència cardíaca d'alta despesa), pèrdua de proteïnes amb hipoalbuminèmia, anèmia per dèficit de ferro, folat i vitamina B12 i possibles complicacions infeccioses (broncopneumònia i sepsis d'origen cutani). L'eritrodèrmia pot aparèixer per progressió d'una psoriasi en plaques o bé com a manifestació d'una psoriasi inestable amb gran component inflamatori, sol ser secundària a una infecció, a un tractament tòpic agressiu com l'alquitrà o a la retirada d'alguns tractaments com la corticoteràpia sistèmica o, en ocasions, la ciclosporina. S'aconsella ingrés del pacient pel control de les possibles alteracions hemodinàmiques i electrolítiques.

Cal mencionar també aquelles formes de psoriasi que apareixen en localitzacions especials com la psoriasi del cuir pilós, de mucoses i ungueal.

1. **Cuir pilós:** és molt freqüent, sobretot en nens i adults joves. Pot constituir la única manifestació de la malaltia, sent difícil diferenciar-la d'una dermatitis seborreica.
2. **Mucoses:** l'afectació de les mucoses és poc freqüent. Pot trobar-se afectada en les formes greus de psoriasi com la forma eritrodèrmica i la pustulosa. S'observen lesions en forma de plaques de color blanquinós o groguenques. L'afectació lingual no és infreqüent. En un estudi recent es va demostrar que el 15,4% dels pacients amb psoriasi presentaven lesions linguals (Zargari 2006): el 8,2% presentaven una llengua fisurada, el 5,6% una llengua geogràfica i el 1,6% una combinació de les dues formes anteriors. L'afectació de la zona genital és poc freqüent. Clínicament són lesions poc queratòsiques i que solen acompanyar-se de plaques de psoriasi invertida a la regió inguinal o perianal.
3. **Onicopatia psoriàsica:** l'afectació ungueal, que pot observar-se en un 50% dels pacients (Kaur, Saraswat et al. 2001), té una morfologia característica i es manifesta en forma de decoloració groguenca en "taca d'oli", que acaba donant lloc a onicolísi i onicodistròfia amb hiperqueratosi subungueal (amb freqüent onicomicosi associada) quan s'afecta la matriu distal, i el típic piquetejat de la làmina ungueal, irregular, quan s'afecta la matriu proximal. L'afectació ungueal constitueix un marcador freqüent d'associació amb artritis psoriàsica distal.
4. **Artropatia psoriàsica:** L'artritis psoriàsica va ser definida originàriament per Moll i Wright com una artritis seronegativa inflamatòria en presència de psoriasi. Es continua utilitzant la classificació d'aquests autors en 5 tipus (Moll and Wright 1973):
 - Oligoartritis asimètrica (30-50%).
 - Poliartritis simètrica similar a l'artritis reumatoide (30-50%).
 - Espondilitis (5%).
 - Artritis de les articulacions interfalàngiques distals aïllada.
 - Artritis mutilant.

L'artritis psoriàsica clàssica consisteix en oligoartritis asimètrica, afectació interfalàngica distal, dactilitis i entesitis calcània. La prevalença d'artritis

psoriàsica podria arribar a un 25% dels pacients amb psoriasi, i només en un 10% dels casos l'afectació articular precedeix a la cutània (Palazzi, Lubrano et al.).

1.1.5 HISTOPATOLOGIA

El patró de reacció psoriasiforme es descriu morfològicament com a la presència d'hiperplàsia epidèrmica amb elongació regular de les crestes interpapil·lars. Aquesta definició abarca a un grup heterogeni de quadres dermatològics: psoriasi, síndrome de Reiter, pitiriasis rubra pilaris, parapsoriasi i líquen simple crònic.

La psoriasi és el prototip de patró de reacció psoriasiforme i es caracteritza per una hiperproliferació anormal de l'epidermis.

La psoriasi és un procés dinàmic, i les troballes histològiques varien en funció del moment evolutiu de la lesió biopsiada:

- A) A les lesions inicials s'aprecia dilatació i congestió dels capil·lars de les papil·les dèrmiques, i un discret infiltrat inflamatori perivascular. A l'epidermis pot haver-hi una lleu espongiosi de les capes basals amb exocitosi d'alguns limfòcits.
- B) A continuació, a l'epidermis desapareix la capa granulosa de manera focal i per sobre es formen petits monticles de paraqueratosi. Cada cop augmenta més l'edema a les papil·les dèrmiques i s'augmenta el nombre de vasos sanguinis de petit calibre, tapissats per cèl·lules endotelials tortuoses. Al voltant d'aquests vasos s'observa un moderat infiltrat inflamatori on predominen els limfòcits T.
- C) Posteriorment es produeix una sortida de neutròfils cap a l'epidermis des dels vasos de les papil·les, conegut com el fenomen de la papil·la xorrejant, descrit per Pinkus i Mehregan (Pinkus and Mehregan 1966). Aquests neutròfils travessen l'epidermis i es dirigeixen cap a les cúspides dels monticles de paraqueratosi formant els anomenats microabscessos de Munro.
- D) Encara que menys freqüent, també es poden formar col·leccions de neutròfils a la capa espinosa, conegudes com les pústules espongiformes de Kogoj.

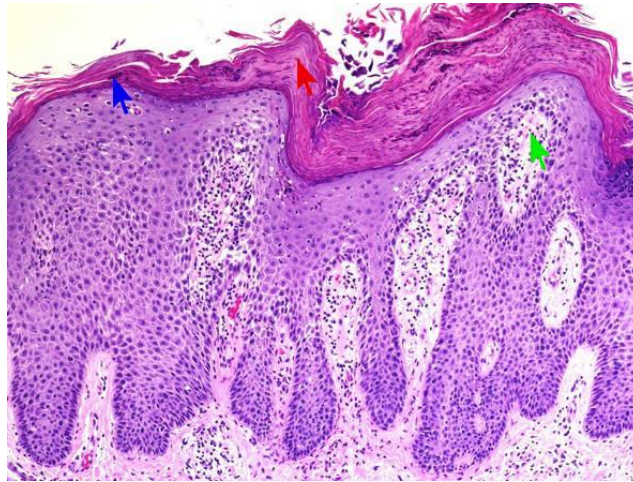


Fig 2. Imatge histològica típica de psoriasi amb presència de hiperqueratosi, paraqueratosi, microabscessos de Munro, i dilatació capil·lar (Dermatology Glossary and Images: www.skincareguide.ca/glossary/index.html).

La psoriasi eritrodèrmica presenta un aspecte histològic similar al descrit en les lesions inicials de psoriasi, amb marcada dilatació dels vasos superficials i absència de la capa còrnia.

En les plaques de psoriasi tractades existeix una disminució progressiva de l'infiltrat inflamatori, de la hiperplàsia epidèrmica i una renovació de la capa granulosa, persistint la dilatació dels vasos de les papil·les dèrmiques. A partir de les 10-14 setmanes de tractament l'aspecte histològic torna a ser normal (Kanerva, Lauharanta et al. 1982).

1.1.6 ÍNDEX DE GRAVETAT I QUALITAT DE VIDA

Per mesurar la gravetat de la psoriasi s'han ideat molts instruments. El PASI (Psoriasis Area and Severity Index) va ser definit al 1978 per Fredriksson i Pettersson (Fredriksson and Pettersson 1978) i fins ara ha estat el sistema de mesura més utilitzat i també el més discutit. El PASI valora l'eritema, la descamació i la infiltració de les lesions (amb una escala del 0 al 4) per separat en les diferents zones del cos (cap, extremitats superiors, extremitats inferiors i tronc). A cada àrea se li assigna un percentatge d'extensió corporal (el cap correspon a un 10% de l'extensió corporal, les extremitats superiors a un 20%, les inferiors a un 40% i el tronc a un 30%). Aquests paràmetres introduïts a la fórmula donen lloc a un número PASI que pot oscil·lar entre 0 (si no hi ha lesions) i un màxim de 72.

La fórmula amb la qual es calcula el PASI és la següent:

$$\text{PASI} = 0,1 * S_c * (E_c + I_c + D_c) + 0,2 * S_s * (E_s + I_s + D_s) + 0,3 * S_t * (E_t + I_t + D_t) + 0,4 * S_i * (E_i + I_i + D_i)$$

On la S és la puntuació corresponent a l'extensió, E a l'eritema, I a la infiltració o gruix, i D la corresponent a la descamació a cada zona, i els subíndex c, s, t, i corresponen a les regions cap/coll, extremitats superiors, tronc i extremitats inferiors, incloent les natges, respectivament.

Però presenta dos inconvenients: no es tracta d'una escala proporcional ja que un pacient amb un PASI de 10 ja es considera una psoriasi greu, i existeix subjectivitat del metge a l'hora d'assignar un número al grau d'eritema, descamació, i infiltració. Per valorar l'eficàcia d'un tractament s'ha ideat el PASI 25, PASI 50, PASI 75 i PASI 100. Un PASI 50 correspondria al percentatge de pacients que arriben a una disminució del 50% del PASI inicial.

Existeixen altres escales per mesurar la gravetat de la psoriasi: SAPASI (Skin Administered Psoriasis Area and Severity Index), PASS (Psoriasis Assessment Severity Store), SPI (Salford Psoriasis Index), PGA (Psoriasis Global Assessment) i NAPSÍ (Nail Psoriasis Severity Index).

El concepte de qualitat de vida és molt ampli i abarca aspectes tant físics, com psicològics, intel·lectuals o socials (Jonas-Caballero and Peñas 2002). La psoriasi és una de les dermatosis en les quals existeix una major experiència en relació a la qualitat de vida. Nombrosos estudis demostren com la psoriasi presenta un efecte negatiu sobre el benestar físic i emocional dels pacients. Gupta i Gupta van mostrar que el 7% dels pacients amb psoriasi confessaven ideació suïcida (Gupta and Gupta 1998), mentre que Finlay i Coles que el 80% considerava que seria "millor" patir bronquitis, asma o diabetes (Finlay and Coles 1995).

El DLQI (Dermatology Life Quality Index) és probablement el test més utilitzat i va ser dissenyat per Finlay i Khan al 1994 (Finlay and Khan 1994). Consisteix en un qüestionari de 10 preguntes que valoren els símptomes de la malaltia, les alteracions en activitats quotidianes, oci, treball, relacions interpersonals i la influència del tractament. Tots aquests paràmetres es valoren del 0 (res en absolut) al 3 (moltíssim). Es tracta d'un test fiable i vàlid però poc sensible als canvis.

Altres tests utilitzats a Dermatologia són el SKINDEX-29 i el SIP (Sickness Impact Profile). També s'han dissenyat formularis específics de psoriasi: PDI (Psoriasis Disability Index), PQOL-12 (Psoriasis Quality of Life Questionnaire 12), EUOPSO (European Federation of Psoriasis Associations) i el PLSI (Psoriasis Life Stress Inventory).

1.1.7 PRONÒSTIC

La psoriasi és una malaltia crònica de la pell i/o articulacions que cursa a brots amb períodes asimptomàtics entre ells. Aquesta evolució és molt irregular i imprevisible a cada pacient. A més, l'afectació cutània mostra una gran variabilitat clínica entre els diferents malalts i en un mateix malalt en diferents èpoques de la seva vida. Els tractaments es van adequant a cada fase de la malaltia en les diferents èpoques d'aquesta.

De totes les formes de psoriasi, la guttata és la que té un millor pronòstic. En nens i en embarassades també el pronòstic és millor. És freqüent observar com en general amb els anys la malaltia es fa menys severa.

1.1.8 DIAGNÒSTIC

La psoriasis vulgar presenta lesions molt característiques que fa que sigui fàcilment reconeixible per la clínica. En altres tipus de psoriasi, per exemple la pustulosa o l'eritrodèrmica, el diagnòstic clínic és més difícil i hem d'explorar minuciosament tota la pell, incloent mucoses, cabell i ungles i realitzar una correcta anamnesi.

Existeixen maniobres clàssiques molt útils com el raspat metòdic de Brocq que ens ajuden a confirmar el diagnòstic. Però serà la biòpsia cutània qui ens donarà el diagnòstic de certesa.

Entre els diagnòstics diferencials trobem les dermatosis eritematodescamatives restants com la dermatitis seborreica i els eccemes, o dermatitis d'altres etiologies com la micosis, el lupus eritematós cutani, la pitiriasis rubra pilaris, la malaltia de Bowen, el líquen simple crònic, el líquen pla, la pitiriasi liquenoide, la pitiriasi rosada de Gibert, i el Paget extramamari.

1.1.9 TRACTAMENT

En els últims anys s'ha avançat notablement en el tractament de la psoriasi. Han aparegut nombrosos tractaments, tant tòpics com sistèmics, gràcies al major coneixement de la patogènia de la malaltia.

Com a norma general, és preferible iniciar el tractament amb procediments senzills i augmentar la complexitat dels mateixos en funció de la resistència o el fracàs, reservant la fototeràpia i els tractaments sistèmics pels casos més severos.

Abans d'iniciar un tractament cal fer entendre al pacient el caràcter crònic de la seva malaltia i cal ensenyar-li com prevenir els nous brots: evitant els traumatismes de la pell, evitant la ingesta de fàrmacs desencadenants o l'estrés, i tractant precoçment les infeccions estreptocòciques.

Els tractaments s'han d'individualitzar en funció de la forma clínica, la localització de les lesions, la seva extensió i les circumstàncies personals (van de Kerkhof and Vissers 2004; Casanova, Marti et al 2004).

Es recomana començar amb un tractament senzill i còmode, preferiblement en règim de monoteràpia. Un cop aconseguit el blanquejament o bé una notable milloria, es procedeix a retirar el fàrmac de forma progressiva. S'aconsella establir teràpies rotatòries (van de Kerkhof 2001) i evitar tractaments desproporcionats tot i la insistència d'alguns pacients. Els corticoides sistèmics estan contraindicats pel risc de desencadenar una eritrodèrmia, i es limitarà l'ús dels corticoides tòpics sobretot a nivell de la cara i els plecs. En nens i ancians s'evitarà l'ús de corticoides tòpics d'alta potència.

Tractament TÒPIC:

- Corticoides: són els fàrmacs més utilitzats ja que són eficaços, quasi mai produeixen reaccions al·lèrgiques, no taquen, no irriten ni fan mala olor. L'eficàcia d'un corticoide tòpic depèn de la seva potència. Per aconseguir el blanquejament de la psoriasi es precisen de corticoides d'alta potència o molt alta potència (per exemple el propionat de clobetasol al 0,05%) durant 3 o 4 setmanes, i després cal retirar-lo de forma lenta (aplicació 2 dies a la setmana). Per evitar els efectes secundaris, locals i sistèmics, hem de procurar no sobrepassar els 45gr setmanals ni utilitzar-los més de 8 setmanes consecutives. Tampoc s'administraran en nens o ancians, ni en cara ni plecs, on la pell és més fina.

- Alquitrans: obtinguts de la destil·lació de la fusta i de la hulla, s'utilitzen a concentracions entre l'1% i el 5%, sobretot en aquells tipus de psoriasi en plaques no molt extensa (Schmid and Korting 1996). També s'utilitzen en oclusió per la psoriasi palmoplantar (Kumar, Kumar et al. 1997), i com a base del mètode Goeckerman consistent en la realització posterior de fototeràpia per la psoriasi extensa (Jordan, Clarke et al. 1981). Són mal acceptats per la seva mala olor, perquè taquen la pell i la roba, i per la seva capacitat de irritació.
- Antralina: és la base del mètode Ingram. Aquest consisteix en ingressar el pacient, aplicar-li la pasta d'antralina durant la nit per exposar-lo el següent matí a fototeràpia UVB. La concentració d'antralina es va augmentant cada 2-3 dies (des del 0,1% fins al 2-3%), aconseguint el blanquejament de les lesions en 8-12 setmanes (Ross and Guptill 1982). El seu principal inconvenient és la irritació cutània. Ja que es tracta d'un dels antipsoriàsics tòpics més potents, la seva principal indicació consistiria en la psoriasi en plaques moderada, abans d'iniciar un tractament sistèmic.
- Derivats de la vitamina D: es comercialitzen tres derivats: el calcipotriol, el tacalcitol i el calcitriol. Actuen disminuint la proliferació dels queratinòcits i induint la seva diferenciació. Tenen una eficàcia similar als alquitrans i als corticoides de mitjana potència (Ashcroft, Po et al. 2000; Kragballe, Gjertsen et al. 1991), però són més cosmètics i tenen menys efectes secundaris.
- Retinoides: La diana terapèutica del tazaroté és el queratinòcit, és capaç de disminuir els marcadors de la diferenciació i de la proliferació i alhora modular la inflamació (Chandraratna 1997). S'ha comprovat que el tazaroté en gel al 0,05% o 0,1% és efectiu com a monoteràpia de primera línia a la psoriasi, amb una acció ràpida i sostinguda al finalitzar el tractament (Weinstein 1996).

Fototeràpia:

- Fototeràpia UVB clàssica: La teràpia UVB de banda ampla té un espectre de radiació per sota dels 300nm i permet una resposta satisfactòria en el tractament de la psoriasi en gotes i de la psoriasi de distribució seborreica.

Entre els efectes a curt plaç s'inclou l'eritema, la xerosi, el prurit, i una major freqüència de reinfeccions pel virus herpes simple. A llarg plaç s'ha demostrat un major fotoenvelliment i carcinogènesi. A partir de la dècada dels anys 70 es va observar que la banda d'UVB situada entorn als 311nm resultava eficaç en el tractament de la psoriasi (Fisher 1976), tant a curt com a llarg plaç (van Weelden, van der Leun et al. 1984). Amb la teràpia UVB de banda estreta cal esperar una resposta satisfactòria en el 80-90% dels casos, amb un blanquejament superior al 50%, després d'una mitja de 20-30 sessions administrades amb una freqüència de 2 a 3 a la setmana (Cameron, Dawe et al. 2002).

- Teràpia PUVA: consisteix en la interacció entre la radiació ultravioleta A i un fàrmac fotosensibilitzant, el psoralé, que condiciona reaccions fototòxiques repetides i controlades. L'espectre terapèutic de la PUVAteràpia té un pic de longitud d'ona entre els 320nm i els 355nm. El psoralé més utilitzat en el nostre medi és el 8-MOP a dosi de 0,6-0,8mg/Kg via oral dues hores abans de la sessió de fototeràpia. També es poden realitzar banys en una solució de 8-MOP o l'aplicació de psoralé exclusivament en àrees afectades a través d'una emulsió lipofílica, i a continuació realitzar les sessions d'UVA. La teràpia PUVA oral o tòpica és un alternativa de primera elecció en el tractament de la psoriasi en plaques greu i en formes d'extensió moderada que no responen a tractament tòpic o teràpia UVB. Les taxes de remissió completa són superiors al 90%, després d'unes 20-25 sessions. Entre els efectes secundaris es troben la fototoxicitat (Morison, Marwaha et al. 1997), la intolerància oral al 8-MOP, el prurit, l'hepatotoxicitat (Freeman and Warin 1984), la fotocarcinogènesi cutània a llarg plaç (Nijsten and Stern 2003) i la fototoxicitat ocular.

Tractament SISTÈMIC:

- Metotrexat (Roenigk, Auerbach et al. 1998): va ser el primer fàrmac sistèmic eficaç en el tractament de la psoriasi. Posseeix efectes antimitòtics, és un potent antiinflamatori i té propietats immunosupressores. Està indicat en el control de la psoriasi moderada o greu que no respon a tractaments tòpics o fototeràpia i en el tractament de l'artritis psoriàsica. Entre els seus efectes

adversos els més freqüents són la mielosupressió i l'hepatotoxicitat a llarg plaç.

- Retinoides (Yamauchi, Rizk et al. 2004): l'acitretí s'utilitza en el tractament de la psoriasi des del 1997. Modula la diferenciació cel·lular epidèrmica, disminueix l'eritema, la descamació i la infiltració de les plaques i també redueix la inflamació. És molt efectiu en la psoriasi pustulosa, tant la generalitzada com la palmoplantar, i en l'eritrodèrmia psoriàsica. Entre els seus efectes adversos destaca la teratogenicitat, la xerosi mucocutània, el pseudotumor cerebri, la hiperlipèmia, l'hepatotoxicitat i els símptomes múscul-esquelètics.
- Ciclosporina (Ferrándiz and Hernánz 2000): és un immunosupressor no mielotòxic ni citostàtic, que bloqueja la síntesi de citoquines proinflamatòries en els limfòcits T activats. Està indicada en pacients amb psoriasi greu per la seva intensitat, extensió i/o localització, o psoriasi que no respon a tractaments tòpics o sistèmics o que estan contraindicats, psoriasi eritrodèrmica, psoriasi pustulosa, artritis psoriàsica, i psoriasi en nens i embarassades. Entre els seus efectes adversos la nefrotoxicitat és el més important, seguit de la hipertensió arterial i les neoplàsies.

Teràpia biològica (Krueger 2002):

Des de fa uns anys és possible el tractament de la psoriasi amb molècules generades per biologia molecular per mitjà de la tecnologia d'ADN recombinant. Aquestes molècules que actuen inhibint de forma selectiva l'activació i maduració de les cèl·lules presentadores d'antigen, l'activació i proliferació dels limfòcits T, la seva migració a la pell i la seva funció efectora o reactivació i secreció de citoquines, evitant una immunosupressió global.

Els tractaments biològics es poden classificar en anticossos monoclonals (efaluzimab, adalimumab, infliximab, ustekinumab) o proteïnes de fusió (etanercept, alefacept).

Els anticossos monoclonals són anticossos que s'uneixen a proteïnes localitzades a la superfície cel·lular dels limfòcits T. Poden ser quimèrics, humanitzats i humans. Els humans són 100% d'origen humà; els quimèrics estan constituïts per una fracció constant d'origen humà (Fc) i una fracció variable (Fab) d'origen murí; i els anticossos humanitzats presenten una fracció constant d'origen humà i una fracció variable mixta (humana i murina). Les proteïnes de fusió són molècules que estan constituïdes per la unió de seccions de diferents

proteïnes. Les proteïnes de fusió utilitzades a la psoriasi estan formades per un receptor d'una proteïna humana unida a la fracció constant d'una immunoglobulina. Per constatar l'origen del fàrmac s'afegeixen les diferents terminacions: *ximab* si són anticossos quimèrics, *zumab* si són anticossos humanitzats, *umab* si són anticossos humans o *cept* si són proteïnes de fusió.

Els seus avantatges són l'eficàcia i la rapidesa d'acció en les formes moderades o severes de psoriasi, les remissions a llarg plaç, la minimització del risc de toxicitat sistèmica i la comoditat pel pacient.

La teràpia biològica representa un avanç en el maneig a llarg plaç de la psoriasi, sobretot en aquells casos en els quals ha fracassat, està contraindicada o són intolerants a la teràpia sistèmica convencional.

Les limitacions administratives i el cost priven situar-la com a primera línia de tractament.

1.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMÀ (VPH)

1.2.1 CONCEPTE

Els Papilomavirus pertanyen a la família *Papillomaviridae*, família de virus d'ADN de simetria icosaèdrica, genoma circular i que careixen d'envoltura.

Fins el 2005 els papilomavirus estaven inclosos dins la família *Papovaviridae*, juntament amb els Poliovirus i el Virus vacuolant del Simi 40 (SV40) (inclòs finalment en els Poliovirus), però el descobriment continu en els últims anys de nous gèneres de papilomavirus, i les diferències entre els gèneres que componien aquesta família *Papovaviridae*, va dur a l'establiment dels papilomavirus com a una família independent.

Actualment s'han descrit més de 200 genotips de papilomavirus en el món animal, dels quals més de 100 (Bernard 2005) s'aïllen en l'ésser humà i almenys 30 tenen relació amb l'àrea genital (Munger and Howley 2002).

1.2.2 ESTRUCTURA I CLASSIFICACIÓ

Els membres que pertanyen a aquesta família presenten càpsides de simetria icosaèdrica, sense envoltura, d'un tamany entre 40 i 55 nanòmetres. La densitat dels virions en Clorur de Cesi (CsCl) és de 1,34g/cm³.

Respecte al genoma, aquest constitueix aproximadament el 10-13% del pes de la partícula viral i consta d'una molècula no segmentada i circular d'ADN de doble cadena. El genoma complet té un tamany de 5300-8000 nucleòtids i un contingut en guanines i citosines del 40-50%.

La classificació de la família *Papillomaviridae* és la següent:

- *Gènere Alphapapillomavirus*: infecten preferencialment la mucosa oral o anogenital en humans i primats. Espècie tipus: VPH32.
- *Gènere Betapapillomavirus*: infecten principalment la pell d'humans. Espècie tipus: VPH5.
- *Gènere Gammapapillomavirus*: causen lesions cutànies en humans que es distingeixen histològicament per cossos d'inclusió intracitoplasmàtics espècie-específics. Espècie tipus: VPH4.
- *Gènere Deltapapillomavirus*: indueixen fibrolipomes a l'hoste. Espècie tipus: Papilomavirus de l'ant europeu.
- *Gènere Epsilonpapillomavirus*: causen papilomes cutanis en el bestiar boví. Espècie tipus: Papilomavirus boví (VPB5).
- *Gènere Zetapapillomavirus*: causen lesions cutànies a cavalls. Espècie tipus: Papilomavirus equí 1.
- *Gènere Etapapillomavirus*: causen lesions cutànies en aus. Espècie tipus: Papilomavirus del pinçà.
- *Gènere Thetapapillomavirus*: causen lesions cutànies en aus. Espècie tipus: Papilomavirus de l'loro gris de cua vermella.
- *Gènere Iotapapillomavirus*: causen lesions cutànies en rosegadors. Espècie tipus: Papilomavirus de la rata africana.
- *Gènere Kappapapillomavirus*: causen lesions en pell i mucoses de rosegadors. Espècie tipus: Papilomavirus del conill de cua de cotó (CRPV).
- *Gènere Lambdapapillomavirus*: causen lesions en pell i mucoses en gossos i gats. Espècie tipus: Papilomavirus caní oral.
- *Gènere Mupapillomavirus*: causen lesions cutànies en humans distingibles histològicament per cossos d'inclusió intracitoplasmàtics espècie-específics. Espècie tipus: VPH1.
- *Gènere Nupapillomavirus*: causen lesions cutànies benignes i malignes en humans. Espècie tipus: VPH41.
- *Gènere Xipapillomavirus*: provoquen l'aparició de papilomes en superfícies cutànies o mucoses del bestiar boví. Espècie tipus: Papilomavirus boví 3 (PVB3).

- *Gènere Omkripapillomavirus*: aïllats de berrugues genitals de cetacis. Espècie tipus: Papilomavirus de la marsopa negra.
- *Gènere Pipapillomavirus*: causen lesions en mucoses de hámsters. Espècie tipus: Papilomavirus oral del hámster.

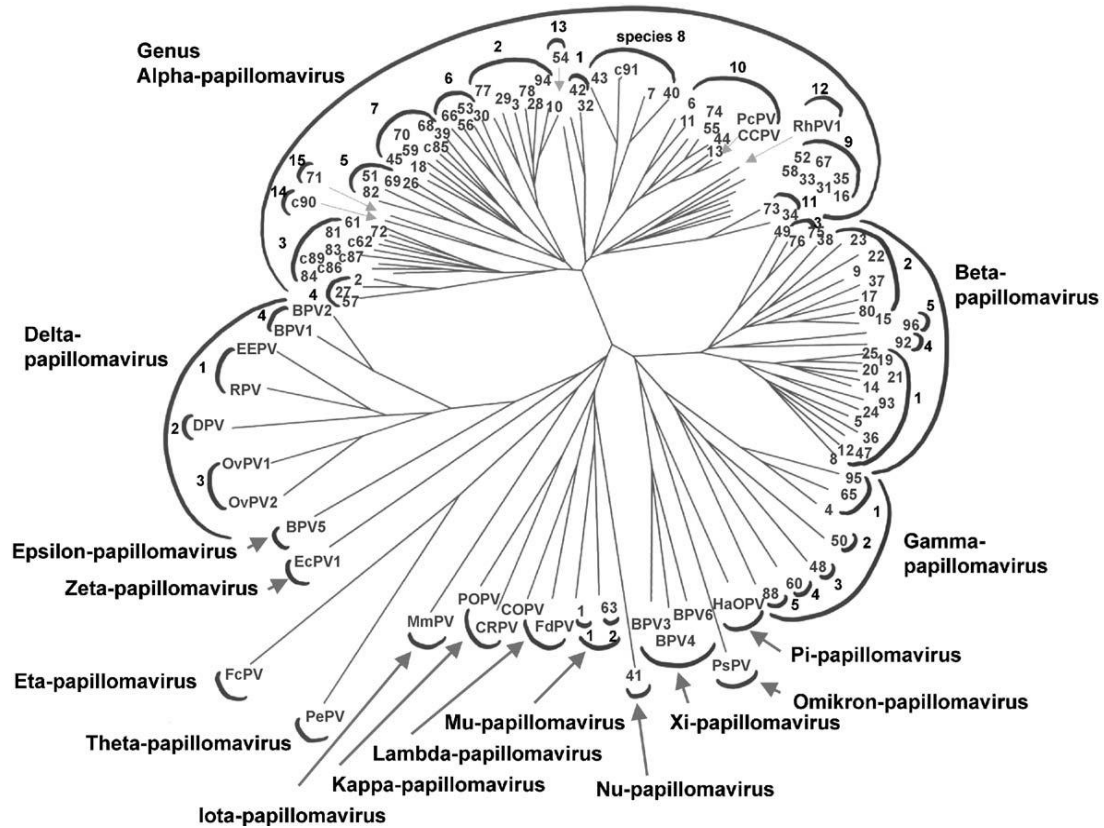


Fig 3. Arbre filogenètic del Virus del papiloma humà (de Villiers, Fauquet et al. 2004)

Recentment, gràcies a l'avanç en seqüenciació del genoma s'han redefinit els criteris de classificació. Es compara la seqüència dels gens L1, E6, i E7 de VPH amb la dels tipus prèviament coneguts, i si la homologia és menor del 90% es considera un nou tipus (Isom et al. 1996).

Els VPH de transmissió genital es classifiquen dins del subgrup conegut com Alfa-papilomavirus o supergrup A (de Villiers, Fauquet et al. 2004). A aquest grup hi pertanyen virus com el VPH6 i 11 que afecten al voltant de l'1% de la població sexual activa, i es troben generalment associats a papilomes benignes. Contràriament, els virus d'alt risc del supergrup A, com els VPH16 i 18, causen lesions a la mucosa genital que poden progressar

a lesions neoplàsiques d'alt grau i càncer. Aquest subgrup de papilomavirus també inclouen virus amb tropisme cutani com els VPH2 i 10 els quals són la principal causa de les berrugues comuns.

El segon grup important de papilomavirus està inclòs dins del supergrup B. Els virus del subgrup B1, com el VPH5 (també coneguts com Beta-papilomavirus o virus de l'Epidermodisplasia verruciforme), causen lesions inaparents o latents a la població general, encara que poden arribar a ser un problema en individus immunodeprimits i en individus amb defectes hereditaris, ja que són els més susceptibles a la infecció d'aquest subgrup. Alguns pacients poden desenvolupar a nivell del lloc d'infecció del VPH i a través dels virus d'aquest subgrup un càncer de pell epitelial no melanocític. És el cas dels pacients amb Epidermodisplasia verruciforme que presenten 2 mutacions en el cromosoma 17q25: EVER1, EVER2, i una mutació en un gen del cromosoma 2p. Aquestes mutacions donen a lloc un defecte de la immunitat cel·lular que produeix una incapacitat per reconèixer i rebutjar les cèl·lules presentadores d'antígens de VPH. Es produeix aparició de berrugues de forma generalitzada i fins a un 50% dels pacients poden desenvolupar carcinomes escamosos a l'edat adulta. Per contrast, els virus del subgrup B2, com el VPH4 (també coneguts com Gamma-papilomavirus) causen berrugues cutànies a la població general, que poden ser similars superficialment a les causades pel papilomavirus del supergrup A com el VPH2.

El grup restant de papilomavirus està dins del supergrup E (també conegut com Mu i Nu-papilomavirus). Només es coneixen tres membres a nivell humà i causen papilomes cutanis a la població general. El VPH1 és el tipus més estudiat dins d'aquest grup i com el VPH2, causa berrugues comuns i plantars.

1.2.3 MALALTIES

A més d'existir una correlació entre els diferents genotips de papilomavirus i l'espècie animal a la qual infecten, existeix també una correlació entre els diferents genotips de VPH i les lesions que produeixen. Aquestes lesions en humans i els genotips relacionats han estat descrits per Smotkin (Smotkin 1989).

Taula I Genotips de VPH i les lesions produïdes en humans.

Genotip VPH	Lesió
1,4	Berrugues plantars i palmars profundes
2,7,29,60	Berrugues vulgars
3, 10, 28	Berrugues planes juvenils
5	Lesions maculars a l'Epidermodisplasia verruciforme
6,11	Condiloma acuminat i displàsia de baix grau
8,9,12,14,15,17,19-25,36	Epidermodisplasia verruciforme
13, 32	Hiperplàsia epitelial oral focal (Malaltia de Heck)
16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58	Displàsia d'alt grau i carcinoma genital invasiu
26	Berrugues cutànies en immunodeprimits
27	Berrugues cutànies en trasplantats renals
30, 40	Carcinoma laringi
34	Malaltia de Bowen extragenital
35	Adenocarcinoma cervical
37	Queratoacantoma
38	Melanoma maligne (1 cas)
41	Candiloma i berrugues planes cutànies
42	Papiloma vulvar
51	Condiloma cervical
53, 56, 59	CIN
54	Condiloma acuminat
55	Papulosis bowenoide
57	CIN, berrugues cutànies, papil·lomes nasals

1.2.4 MÈTODES DE DETECCIÓ

Tal com s'ha comentat anteriorment, el VPH es relaciona directament com a causant de multitud de lesions epitelials. De la mateixa manera que també és coneguda l'associació del VPH amb diferents càncers que poden anar des del càncer de cèrvix uterí, amb una relació del 90%, al càncer de cap i coll, amb només una relació del 5%. Existeixen nombrosos treballs que es centren en l'estudi de la presència del genoma dels diferents tipus de VPH, i és per aquest motiu que s'han desenvolupat tota una sèrie de tècniques de detecció. Les tècniques utilitzades actualment es poden dividir en tres tipus: tècniques serològiques basades en la detecció de proteïnes virals mitjançant anticossos, tècniques de biologia molecular basades en la detecció d'àcids nucleics, i tècniques cel·lulars basades en la detecció de proteïnes expressades intracel·lularment.

Breument es comentaran les tècniques serològiques i les tècniques de biologia molecular ja que són les més freqüentment utilitzades pels investigadors.

Tècniques serològiques:

Dins d'aquestes tècniques, basades en la utilització d'anticossos específics contra proteïnes del VPH, la més utilitzada és l'Assaig per immunoabsorció lligat a enzims (ELISA) i variants d'aquesta tècnica com el sandwich-ELISA i el Radioinmuoassaig (RIA). Aquests mètodes de detecció es basen en la utilització d'anticossos contra la proteïna L1 de la càpside dels virus (Schiller 1999). Per altra banda, alguns autors han utilitzat anticossos enfront als capsòmers E6 i E7 que estan formats per una agregació pentamèrica de monòmers de proteïna L1 (Lehtinen, Pawlita et al. 2003). Més recentment s'ha desenvolupat una nova tècnica més simple i amb un rendiment més alt basada en l'estudi de l'activitat de la fosfatasa alcalina secretada que és expressada en pseudovirus com un gen delatador (Pastrana, Buck et al. 2004).

Tècniques de biologia molecular basades en la detecció d'àcids nucleics:

Aquest conjunt de tècniques de biologia molecular es basen en la detecció del material genètic (ADN) del VPH que es troba contingut a les cèl·lules epitelials infectades. Bàsicament s'utilitzen dues tècniques de detecció d'ADN per determinar la presència del VPH. Per una banda, una amplificació dirigida a l'ADN de VPH mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa^a (PCR), i per l'altra banda, l'ús de tècniques d'hibridació de l'ADN o ARN com el Southern Blot (SB), la hibridació per Dot-Blot (DB) o la Hibridació in situ (ISH) (Cao, Chang et al. 2001).

La PCR ens permet amplificar d'una forma selectiva i reproduïble les seqüències d'ADN del VPH que es troben a les mostres biològiques. L'especificitat i sensibilitat del mètode pot variar en funció dels *primers* o encebadors utilitzats, la mida del producte de PCR, les condicions de la reacció i el rendiment de la polimerasa utilitzada (Iftner and Villa

2003). La majoria de protocols basats en la detecció del VPH per PCR utilitzen *primers* generals o consens dissenyats a partir d'una regió conservada que codifica per la proteïna

^aReacció en cadena de la polimerasa, PCR

La revolució i gran importància que ha significat la tècnica de la PCR en la genètica molecular fa que es mereixi una atenció especial. La PCR, descoberta els anys 80 per Kary Mullis, explota les característiques replicatives de l'ADN. L'ADN-polimerasa fa servir una cadena d'ADN com a motlle per sintetitzar una complementària mitjançant la utilització d'un *primer* o encebador. Les cadenes d'ADN són separades per calor permetent la unió dels oligonucleòtids i l'acció de l'ADN-polimerasa. Aquest procés es repeteix donant a lloc a una amplificació d'una regió específica flanquejada pels *primers*. El gen de la β -globina humana va ser la primera seqüència que es va amplificar amb la PCR (Saiki, Gelfand et al. 1988).

L1 del virus (Bernard, Chan et al. 1994). Altres autors han utilitzat els oncogens E6 i E7 (Koutsky, Ault et al. 2002). Entre aquests *primers* generals trobem la parella GP5/6 (van den Brule, Meijer et al. 1990) i la seva extensió GP5+/6+ (Jacobs, Snijders et al. 1997) la qual correspon a la parella utilitzada en aquest treball per detectar el VPH de les mostres. Per altra banda hi ha autors que també utilitzen la parella de *primers* consens MY09/11 i la seva extensió PGMY09/11. La detecció dels diferents tipus de VPH es pot realitzar per mitjà de tècniques d'hibridació i de sondes específiques. S'utilitzen diferents formats de mètodes de detecció com l'assaig revers d'hibridació en línia o Reverse Line Blot assay (RLB) que és el mètode utilitzat en aquest treball com a detecció específica dels diferents tipus de VPH (Kleter, van Doorn et al. 1998; Gravitt, Peyton et al. 2000).

Cal destacar que les tècniques d'hibridació a partir d'ADN o ARN no amplificat com el Southern Blot (SB), hibridació per Dot-Blot (DB) Hibridació in situ (ISH) presenten una sèrie de limitacions a l'hora de detectar els VPH. Per un costat els mètodes SB i DB requereixen uns nivells d'ADN important i no són reproduïbles. Per altra banda, el ISH presenta una sensibilitat molt baixa. Generalment els mètodes basats amb l'amplificació per PCR presenten una sensibilitat més elevada que els assajos basats únicament amb mètodes hibridació ja que per PCR es poden detectar d'1 a 10 còpies de genoma viral per reacció (Zaravinos, Mammas et al. 2009).

A més de les tècniques basades en la PCR també s'utilitza de forma freqüent en estudis d'epidemiologia el mètode de captura d'híbrid d'ADN de VPH tant de segona generació (HC-2) com de tercera generació (HC-3). Aquesta tècnica es basa en la utilització de sondes d'ARN complementàries de forma específica a les seqüències del diferents tipus de VPH. Mitjançant aquestes sondes d'ARN es formen híbrids amb l'ADN de les mostres biològiques obtenint híbrids ARN-ADN del VPH. Aquests híbrids són detectats mitjançant anticossos específics contra l'híbrid ARN-ADN en el mètode HC-2 (Peyton, Schiffman et al. 1998). En el de tercera generació (HC-3) les sondes específiques d'ARN estan biotinilades així la detecció de l'híbrid ARN-ADN es fa mitjançant anticossos específics contra la biotina (Lörinez 2001).

1.3 RELACIÓ ENTRE EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMÀ I LA PSORIASI

La psoriasi és una dermatosi inflamatòria crònica de genètica complexa i distribució mundial la base patogènica de la qual no està clara. Tot i això, és conegut que l'activació del limfòcits T juga un paper crucial en el mecanisme immunològic de la psoriasi, ja que

promouen una proliferació epidèrmica incontrolada. La naturalesa de l'antigen responsable de l'activació dels limfòcits T és un tema de controvèrsia.

S'ha descrit en nombrosos articles una alta prevalença de beta-papilomavirus en pacients amb psoriasi, sobretot el VPH5 i el 36, suggerint que aquests virus podrien correspondre a l'antigen causal de la cascada immunològica (Majewski, Jablonska, et al. 1999). Majewski i col·laboradors a l'any 1999 proposen un model on les proteïnes de la càpside del VPH contribueixen a la proliferació epidèrmica servint com a potencials antígens reconeguts pels limfòcits B i T autoreactius (Majewski, Favre et al. 1998).

Tot i la hipòtesi proposada, els estudis de la bibliografia només poden afirmar que la psoriasi és un reservori del beta-papilomavirus sense poder demostrar realment que corresponen a l'antigen que promou l'activació dels limfòcits T.

Alguns dels articles on es demostra una elevada prevalença de VPH en pell psoriàsica respecte a pell normal o no psoriàsica són resumits a continuació.

Favre M i col·laboradors a l'any 1998 van recollir 335 mostres de diferents grups de pacients per observar la presència d'anticossos contra VPH5 utilitzant la tècnica d'ELISA. La prevalença d'anticossos contra les partícules del VPH5 era significativament superior en pacients amb psoriasi (24,5%) que en els altres grups (2-5%), on estaven inclosos pacients amb dermatitis atòpica i trasplantats renals. Posteriorment van realitzar un anàlisi de biòpsies cutànies de pell afectada i pell sana mitjançant PCR utilitzant *primers* consens pels beta-papilomavirus. Amb aquesta tècnica van detectar ADN del VPH en el 91,7% de les biòpsies de pell de 48 pacients amb psoriasi comparat amb el 35,5% de les biòpsies de pell de 31 pacients amb dermatitis atòpica. A continuació es van utilitzar *primers* específics pel VPH5, VPH36, i VPH1 detectant-se en el 89,4%; 84,2% i 42,1% de les mostres dels pacients amb psoriasi respectivament, tanmateix el VPH36 també va ser detectat en 22,5% de les mostres dels pacients amb dermatitis atòpica. Favre M i col·laboradors van suggerir que la psoriasi podria correspondre a un reservori del VPH5 però no podien determinar quin era el seu paper patogènic real en aquesta dermatosi (Favre, Orth et al. 1998).

Sonke J Weissenborn i col·laboradors a l'any 1999 arriben a la mateixa conclusió. Analitzen biòpsies de pell afectada de 54 pacients amb psoriasi i biòpsies de pell sana de 42 pacients sans immunocompetents utilitzant una tècnica de PCR amb *primers* consens per a la detecció de beta-papilomavirus. Detecten VPH en el 83% de les mostres psoriàsiques i en

el 19% de les mostres de pell sana. Els tipus de VPH més prevalents en els pacients amb psoriasi detectats per mitjà de *primers* específics van correspondre al VPH36 en un 62% dels casos, al VPH5 en el 38% dels casos i al VPH38 en el 24% dels casos. Es van detectar infeccions múltiples de 2 a 5 tipus diferents de VPH en el 63% de les mostres analitzades (Weissenborn, Hopfl et al. 1999).

Mahé E i col·laboradors a l'any 2003 recullen biòpsies cutànies de 26 nens amb psoriasi, 28 adults amb psoriasi, 15 nens amb dermatitis atòpica i 28 adults amb pell sana. Utilitzen les mateixes tècniques que els autors previs i arriben a conclusions similars. Demostren altes prevalences de beta-papilomavirus en els subjectes afectats per psoriasi: un 38,5% dels nens i un 35,7% de adults, en comparació amb els subjectes controls: un 6,7% dels nens i un 10,1% dels adults. El VPH5 es detecta en el 46,2% dels nens afectats per psoriasi i en el 46,4% dels adults afectats per psoriasi. El VPH36 es detecta en el 15,4% i el 25% de nens i adults afectats per psoriasi respectivament (Mahe, Bodemer et al. 2003).

Prignano G i col·laboradors a l'any 2004 observen en una mostra de 54 pacients afectats de psoriasi una alta prevalença de VPH5 (74,1%) en les àrees afectades per psoriasi i una disminució de la prevalença (33,3%) en les àrees no afectades per psoriasi, comparat amb un 0% en 20 subjectes sans i un 3,6% en àrees lesionals de 28 pacients amb altres patologies inflamatòries. La detecció del VPH5 es va realitzar amb tècniques de PCR amb *primers* específics per aquest virus i l'ADN es va extreure de les escames cutànies. No observen una correlació estadísticament significativa entre la detecció del VPH5 i l'edat, el sexe o les àrees afectades, o entre les àrees exposades o no exposades a raigs ultravioleta. L'índex PASI es va avaluar en els subjectes amb psoriasi i es va dividir en 3 grups segons la presència de VPH5 en (1) negatiu, (2) positiu només en àrees afectades i (3) positiu a nivell de l'àrea afectada i l'àrea no afectada. Es va observar una diferència significativa entre els grups que suggeria que la severitat de la malaltia i la presència de VPH5 estaven associats (Prignano, Ferraro et al. 2005).

Simeone P i col·laboradors a l'any 2005 recullen 11 biòpsies cutànies de pacients amb psoriasi i 3 biòpsies cutànies de pell sana de pacients sotmesos a cirurgia dermatològica. Es procedeix a la detecció de beta-papilomavirus amb l'ús de *primers* consens i amb *primers* específics pel VPH1, VPH5, VPH16 i VPH36. Detecten VPH5 en el 64% de les biòpsies de pell psoriàsica i no observen cap VPH a les biòpsies de pell sana. En dues mostres cutànies de pell psoriàsica es va detectar una co-infecció per VPH5 i VPH1 (Simeone, Teson et al. 2005).

Cronin JC i col·laboradors a l'any 2008 recullen mostres de cel·les i biòpsies cutànies de 20 pacients amb psoriasi i 23 controls sans. Utilitzen la tècnica de PCR amb *primers* consens per a la detecció tant de beta-papilomavirus com gamma-papilomavirus com a novetat. Observen que la prevalença del VPH en les cel·les i en la pell dels pacients amb psoriasi és més elevada que en els controls; 83,3% vs 46,7% respectivament. Els beta-papilomavirus són detectats en el 96,7% dels casos amb psoriasi amb positivitat pel VPH i en el 90,5% dels controls sans amb positivitat pel VPH. Els gamma-papilomavirus són detectats en el 6,78% dels casos positius pel VPH i en el 9,5% dels controls positius pel VPH. Amb l'ús de *primers* específics observen que els VPH més freqüentment detectats en les mostres psoriàsiques corresponen al VPH5, 21 i 14. Tot i això, observen un percentatge baix de detecció en els pacients amb psoriasi del VPH5 i el VPH36, un 19,4% i un 8,3% respectivament. De manera que no donen suport al rol causal específic del VPH5 i VPH36 a la psoriasi tal com ha estat publicat anteriorment, però suggereixen que la pell amb psoriasi pot ser més permissiva de la presència viral que la pell sana. A més, també observen una concordança intrapacient per tipus específics del VPH en les diferents localitzacions la qual cosa fa pensar que un subjecte pot ser colonitzat amb un perfil de beta-papilomavirus excloent els altres tipus (Cronin, Mesher et al. 2008).

A part dels estudis on es demostra una elevada prevalença de beta-papilomavirus en pell psoriàsica també han estat publicats articles on es confirma la seva presència de forma ubiqua en pell o fol·licles pilosos de pacients sans o bé en altres tipus de dermatosis.

Boxman i col·laboradors a l'any 1999 analitzen cabells de pacients trasplantats renals i subjectes immunocompetents, utilitzen la tècnica de PCR amb *primers* específics pel VPH5. Es detecta VPH5 en cabells de 14 de 31 (45%) pacients immunodeprimits i en 21 de 35 (60%) individus immunocompetents. L'ADN del VPH5 va ser detectat en proporcions similars en els 2 grups (Boxman, Mulder et al. 1999).

Antonsson A i col·laboradors a l'any 2003 demostren que la infecció del VPH té una distribució mundial amb un gran espectre de genotips. Estudien biòpsies cutànies de fins a 5 poblacions diferents per mitjà de la tècnica de PCR amb *primers* consens i posteriorment identifiquen el subtipus de VPH comparant les seqüències a la base de dades BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La prevalença de VPH a Bangladesh era del 68%, a

Japó del 54%, a Etiòpia del 52%, a Zàmbia del 42% i a Suècia del 70%. Una gran multiplicitat de genotips són detectats amb la troballa de 88 tipus diferents de VPH en 142 mostres positives per ADN de VPH. Dos o tres genotips diferents es detecten en una mateixa mostra. El VPH més freqüentment detectat és el VPH5 amb una prevalença total del 6,5% (Antonsson, Erfurt et al. 2003).

Favre M i col·laboradors a l'any 2000 observen una elevada prevalença d'anticossos contra el VPH5 per mitjà de tècniques ELISA en processos no psoriàsics on la reparació epidèrmica també és important. En pacients amb malalties ampul·loses autoimmunes observen una detecció d'anticossos contra el VPH5 en el 57,9% dels casos (Favre, Majewski et al. 2000).

Viviano E i col·laboradors a l'any 2007 recullen 37 biòpsies de pell de pacients amb psoriasi i 36 biòpsies de pell de controls sans. Utilitzen *primers* consens per a la detecció de beta-papilomavirus i observen una prevalença de VPH del 71% en les mostres psoriàsiques i del 58,3% en les mostres de pell sana. El VPH5 només presentava una prevalença del 7,4% en els casos psoriàsics i el VPH36 no es va detectar en cap mostra cutània. El percentatge de detecció del VPH no diferia significativament entre grup psoriàsic i el grup control. De manera que els autors conclouen que els beta-papilomavirus tenen una presència ubiqua en pell afectada i pell sana i fins i tot qüestionen la possible associació del VPH5 i 36 amb la psoriasi (Viviano, Giovannelli et al. 2007).

També cal esmentar aquells articles on proposen que l'elevada prevalença de VPH5 podria ser afavorida per la fototeràpia PUVA.

Sonke J i col·laboradors a l'any 1999 també estudien si la presència dels beta papilomavirus es troba influenciada pel tractament amb fototeràpia PUVA. El percentatge de detecció de VPH entre els pacients amb psoriasi que havien rebut PUVA i el pacients que no havien rebut aquest tractament, no diferia de forma significativa. Els percentatges corresponien a un 77% i a un 89% respectivament. Tanmateix observen que existeix una detecció més freqüent de VPH5 en pell afectada que ha rebut tractament amb PUVA teràpia de forma significativa. Conclouen que la psoriasi pot correspondre a un reservori pel VPH i que la PUVAteràpia podria afavorir la infecció per un tipus seleccionat de VPH, en aquest cas el VPH5 (Weissenborn, Hopfl et al. 1999).

Wolf P i col·laboradors a l'any 2004 recullen cabells de 81 pacients amb psoriasi i els subdivideixen en 3 grups: grup A (exposició a PUVA i història de càncer cutani), grup B (exposició a PUVA i no història de càncer cutani) i grup C (no exposició a PUVA i no història de càncer cutani). Realitzen detecció dels beta-papilomavirus per mitjà de PCR amb primers consens i observen ADN del VPH en el 73% dels casos del grup A, en el 69% del grup B i en el 36% del grup C. De manera que conclouen que la prevalença de VPH a nivell dels fol·licles pilosos està augmentada en aquells pacients amb psoriasi que han rebut tractament amb fototeràpia PUVA (Wolf, Seidl et al. 2004).

No cal oblidar el paper important de les citoquines en la patogènia de la psoriasi i com alguns autors les identifiquen com a les responsables de l'expressió d'alguns VPH.

De Villiers E i col·laboradors a l'any 2001 demostren per mitjà de assajos in vitro que les citoquines proinflamàtores IL-17 i INF γ , induïdes de forma continua a nivell de les lesions de psoriasi, activen el promotor del VPH20 latent, resultant en la replicació activa del virus. Conclouen que la infecció pel VPH no és un factor causal de la psoriasi, però les citoquines proinflamàtores poden activar les regions promotores del VPH específics que es troben en estat latent, afavorint la seva replicació i la seva detecció en pell amb psoriasi (De Villiers and Ruhland 2001).

Per contra, Simeone P Weissenborn i col·laboradors a l'any 2005, arriben a conclusions oposades. Procedeixen a la comparació de secreció d'interleucines 6, 8 i 18 entre cultius de queratinòcits infectats pel VPH5 i cultius de queratinòcits no infectats per mitjà de tècniques d'ELISA. Observen que la producció d'ILs en els queratinòcits infectats és comparable a la produïda per les cèl·lules no infectades i per tant, afirmen que la infecció pel VPH no modula la producció d'ILs. Posteriorment indueixen una estimulació del cultiu de queratinòcits infectats per mitjà de la IL-17. Procedeixen a la detecció de l'ARNm del VPH5 abans i després de l'administració de la IL-17 per observar si realment aquesta és capaç d'activar el promotor del VPH produint una major quantitat d'ARNm. El resultat final és que la estimulació de citoquines falla al intentar augmentar els nivells d'ARNm, o en promoure l'expressió viral en aquelles cèl·lules on l'ARNm no es detectava (Simeone, Teson et al. 2005).

Resumint tota aquesta àmplia informació, observem que a la bibliografia es presenten resultats totalment contradictoris que no ens aclareixen realment quin paper patogènic representa el VPH a la psoriasi.

Mentres que alguns estudis mostren una elevada detecció de beta-papilomavirus en pell o fol·licles pilosos en pacients amb psoriasi en comparació amb individus sans, altres autors detecten aquests virus de forma ubiqua en pell normal sense diferències significatives respecte la psoriasi. Fins i tot cal destacar la presència de VPH5 en malalties amb recanvi epidèrmic important com a les malalties ampul·loses autoimmunes.

També trobem estudis justificant l'elevada prevalença de VPH en els pacients amb psoriasi a causa de la realització de tractament fototeràpic previ que podria facilitar la seva introducció.

Per finalitzar, alguns autors demostren que determinades citoquines promourien l'activació i replicació del VPH latent mentre que altres no observen un augment de la replicació amb la introducció d'IL-17 en cultius de queratinòcits.

Per tant, és difícil concloure si el VPH és un factor causal o no de la psoriasi. La conclusió que es pot extreure de la literatura és que els estudis més recents demostren que es tracta d'un virus àmpliament distribuït i que podria passar de forma latent a activa gràcies al procés de recanvi epidèrmic continu que existeix en la psoriasi, fent més fàcil la seva detecció.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

2.1 JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI D'INVESTIGACIÓ

Existeix un debat continu pel que fa a la prevalença i rellevància dels papilomavirus en l'etiopatogènia de la psoriasi. Les diferències entre les mostres analitzades i els mètodes usats per la detecció papilomavirus en els estudis aportats a la bibliografia fa que sigui difícil comparar les dades directament.

Molts estudis inicialment utilitzen *primers* consens per a la detecció de beta-papilomavirus i posteriorment utilitzen *primers* específics per a la detecció de només alguns tipus específics de VPH, sobretot el VPH5 i 36. Això dona lloc a un biaix d'informació i evita que es puguin detectar altres VPH coexistents.

Cal esmentar també el biaix de confusió en molts articles ja que es produeix la inclusió de pacients amb psoriasi tractats prèviament amb agents immunosupressors tòpics, sistèmics o fototeràpia, modalitats terapèutiques que poden afavorir la infecció pel VPH.

El propòsit del present estudi és utilitzar un mètode ampli i imparcial pel que fa a la detecció d'ADN del VPH evitant així biaixos d'informació. Avaluarem si el VPH beta i també el gamma és més freqüent en pell psoriàsica en comparació amb pell sana, i quins són els VPH específics que estan més sobreexpressats. A més, inclourem pacients psoriàsics de recent diagnòstic els quals no hauran realitzat cap tractament previ evitant així els factors de confusió.

2.2 HIPÒTESI

La pell psoriàsica presenta una elevada prevalença de VPH en comparació amb pell sana.

Hem decidit plantejar aquesta hipòtesi ja que la majoria dels articles que trobem a la bibliografia senyalen una detecció més elevada de VPH en pell psoriàsica respecte la pell sana.

La nostra hipòtesi nul·la (H_0) és la següent: La prevalença del VPH és similar en pell psoriàsica respecte a la pell sana.

La nostra hipòtesi alternativa (H_1) és la següent: La prevalença del VPH és diferent en pell psoriàsica respecte a la pell sana.

2.3 OBJECTIUS

Ens vam proposar els següents objectius:

- 1.** Detecció de la prevalença de VPH (beta i gamma) en pell afectada per psoriasi i en pell sana.
- 2.** Comparació de prevalences de VPH (beta i gamma) entre pell afectada per psoriasi i pell sana.
- 3.** Detecció dels VPH (beta i gamma) que es troben més freqüents expressats en pell afectada per psoriasi i en pell sana.

3. MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 ÀMBIT

L'estudi s'ha realitzat al Servei de Dermatologia de l'Hospital Universitari Sagrat Cor de l'àrea metropolitana de Barcelona Nivell-II.

3.2 TIPUS D'ESTUDI

Es tracta d'un estudi observacional descriptiu transversal de casos i controls.

3.3 PERÍODE D'ESTUDI

Els pacients van ser reclutats entre el 22 de Gener del 2007 i el 22 Gener del 2009.

3.4 MOSTRA

S'han recollit un total de 30 pacients afectats de psoriasi en placa vulgar i 30 pacients no afectats de psoriasi que acudien a cirurgia dermatològica.

CRITERIS DE INCLUSIÓ A L'ESTUDI:

- Casos:
 - Subjectes diagnosticats de psoriasi en placa en base a una clínica i histologia característiques.
- Controls:
 - Subjectes sotmesos a cirurgia dermatològica (carcinomes basocel·lulars, carcinomes espinocel·lulars o melanomes) que requereixen de reconstrucció quirúrgica amb material cutani sa sobrant.

CRITERIS D'EXCLUSIÓ A L'ESTUDI:

- Casos:
 - Pacients menors de 18 anys.

- Pacients que han rebut tractament immunosupressor tòpic previ.
 - Pacients que han rebut tractament immunosupressor sistèmic previ.
 - Pacients que han rebut fototeràpia prèvia.
- Controls:
- Pacients menors de 18 anys.
 - Pacients amb antecedents personals de psoriasi.
 - Pacients que han rebut tractament immunosupressor tòpic previ.
 - Pacients que han rebut tractament immunosupressor sistèmic previ.
 - Pacients que han rebut fototeràpia prèvia.

3.5 CÀLCUL DEL TAMANY MOSTRAL

Donat que existeixen estudis previs pel que fa a la detecció del VPH en mostres de pell, hem realitzat un càlcul sobre el tamany mostral necessari per a la realització del nostre estudi de casos i controls.

Amb les següents premisses conegudes:

- La magnitud de la diferència a detectar, que tingui un interès clínicament rellevant.

Cal conèixer 2 dels següents 3 paràmetres:

- Valor aproximat de l'odds ratio que es desitja estimar (ω)
 - Freqüència d'exposició de casos (p_1)
 - Freqüència d'exposició de controls (p_2)
- Seguretat del 95% ($\alpha=0,05$).
 - Poder estadístic del 80% ($\beta=0,2$)

I utilitzant la següent fórmula:

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

$$z=1.96$$

Hem utilitzat com a exemple l'estudi realitzat per Prignano i col·laboradors (Prignano, Ferraro et al. 2005)

Del recull de 54 mostres cutànies d'àrees lesionals afectades per psoriasi 40 presentaven positivitat pel VPH ($p_1=0,74$) i de 54 mostres cutànies d'àrees de pell sana 18 presentaven positivitat pel VPH ($p_2=0,33$). Observen una elevada prevalença de VPH en pell psoriàsica respecte a pell normal de forma estadísticament significativa ($p<0.05$).

El resultat final del nostre càlcul per mitjà de la fórmula anterior ha donat com a necessaris 22 casos i 22 controls.

En el nostre estudi hem recollit un total de 30 casos i 30 controls.

3.6 PROCEDIMENT

3.6.1. EXTRACCIÓ DE LA MOSTRA DE PELL

Pel que fa als casos es van obtenir les mostres de pell psoriàsica per mitjà d'un punch-biòpsia de 4mm amb posterior fixació de la mostra amb formol i conservació del bloc en parafina. Es van realitzar talls histològics de la mostra i es va portar a terme una tinció amb hematoxil·lina-eosina per a confirmar el diagnòstic histològic de psoriasi.

Pel que fa els controls es van obtenir de mostres de pell sana a partir d'orelletes de pell sobrant de reconstruccions d'exèresis quirúrgiques d'altres lesions cutànies (carcinomes basocel·lulars, espinocel·lulars o melanomes). Les mostres es van tractar de la mateixa manera que les mostres obtingudes de pell psoriàsica, es van fixar amb formol i es va conservar el bloc en parafina. Igualment, es van realitzar talls histològics i tinció hematoxil·lina-eosina per a confirmar l'absència de patologia tumoral a la mostra cutània.

3.6.2 EXTRACCIÓ DE L'ADN

L'ADN es va extreure de les mostres de pell parafinades utilitzant el quit comercial QIAmp® DNA FFPE Tissue (QUIAGEN), especial per a la purificació d'ADN de teixit fixat amb formol i parafinat, d'acord amb el protocol del fabricant.

Protocol d'extracció d'ADN:

1. Eliminar l'excés de parafina del bloc mitjançant la utilització d'un bisturí.
2. Realitzar seccions de 5-10µm de gruix amb el micròtom (Si la superfície de la mostra ha estat exposada a l'aire cal descartar les 2-3 primeres seccions realitzades).

3. Immediatament col·locar les seccions en un tub tipus Eppendorf® de 1,5ml i afegir 1ml de xilè a la mostra. Vortejar de forma vigorosa durant 10seg i centrifugar durant 2min a 12000xg a temperatura ambient. Es dona una extracció de la parafina de la mostra.
4. Eliminar el sobrenadant, addicionar 1ml d'etanol absolut i tot seguit barrejar amb el vòrtex. Centrifugar a 12.000xg durant 2min a temperatura ambient.
5. Treure el sobrenadant amb la pipeta amb cura de no resuspendre el pellet. En aquest pas s'elimina el xilè residual de les mostres.
6. Incubar durant 10min a 37°C per eliminar l'etanol residual que podria interferir en les reaccions enzimàtiques posteriors.
7. Resuspendre el pellet amb 180µL de solució de lisis (ATL). Seguidament afegir 20µL de proteïnasa K, vortejar i incubar a 56°C durant 1hora. Es dona un trencament del teixit, lisis cel·lular i una degradació de les proteïnes.
8. Incubar a 90°C durant 1 hora per revertir les modificacions provocades pel formaldehid de la parafina sobre l'ADN.
9. Fer un pols de centrífuga i afegir 200µL de solució de lisis (AL) i 200 µL d'etanol absolut. Vortejar i centrifugar breument. La solució es tornarà tèrbola i blanquinosa.
10. Aplicar la solució a les columnes de sílica i centrifugar 1min a 6000xg. La sílica de les columnes reté l'ADN.
11. Eliminar l'eluït i aplicar 500µL de solució de rentat 1 (AW1) fent una centrifugació de 1min a 6000xg. Posteriorment repetir el procés amb la solució de rentat 2 (AW2).
12. Centrifugar 2min a 12.000xg per eliminar les restes d'etanol que podrien interferir en les reaccions enzimàtiques posteriors.
13. Elució de l'ADN amb 50µL de solució d'elució (ATE).

Quantificació i qualitat de l'ADN:

Per fer una estimació de la quantitat de l'ADN present a les extraccions realitzades es van utilitzar tècniques espectrofotomètriques. Més concretament es va mesurar l'absorbància de les mostres de l'ADN a 260nm en un Nanodrop®. S'accepta de forma general que una unitat de densitat òptica a 260 nm equival a una concentració de 50µg/ml d'ADN de doble cadena. A partir d'aquesta equivalència i les dades d'absorbància obtingudes es va estimar la concentració d'ADN de cada una de les extraccions.

Per altra banda es va estimar la qualitat i integració de l'ADN extret. Es va portar a terme una amplificació per PCR del gen constitutiu de la β -globina. S'han utilitzat els següents primers, volums de reacció i programa de termociclador.

Primers:

Forward	βG PCO3	5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'
Revers	βG PCO4	5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3'
Revers	βG PCO5	5'-GAAACCCAAGAGTCTTCTCT-3'

Barreja de reacció

dH ₂ O	10,85 µL
10X PCR buffer	2,5 µL
dNTPs 2mM	2.5 µL
dsDNA	5 µL
Oligo 3' (100 pM)	0,25 µL
Oligo 5' (100 pM)	0,125 µL
Taq gold DNA pol.	0,15 µL

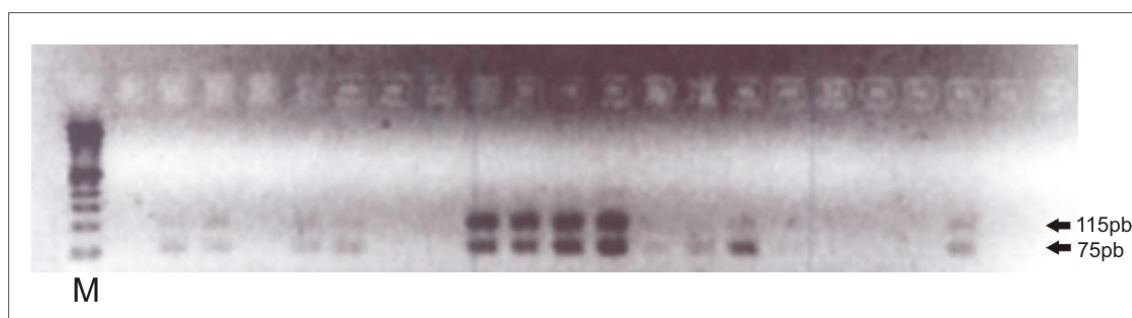
Programa termociclador

9 min. a 94°C desnaturalització inicial	
1 min. a 94°C (desnaturalització)	} 40 cicles
1 min. a 55°C (hibridació)	
1 min. a 72°C (extensió)	
7 min. a 72°C (extensió final)	
Indefinidament a 4°C	

Tot seguit els productes de PCR són analitzats en un gel d'agarosa juntament amb els marcadors de pes molecular per fer una comprovació sobre la mida de l'amplificació. La presència o absència d'amplificació de dues bandes de 75 i 115pb ens indicarà que la mostra és β-globina positiva o negativa respectivament.

Electroforesi d'ADN en gel d'agarosa.

Per la preparació dels gels s'han utilitzat gel d'agarosa de baixa electroendosmosi i els equips MT-1002 d'Ecogen. El percentatge del gel d'agarosa ha estat del 2% i el buffer d'electroforesi utilitzat ha estat el TAE (Tris-Acetate 40mM, EDTA 2mM, pH8). En aquestes condicions l'ADN es mou en base a la seva càrrega negativa i es separa en funció de la seva longitud i conformació. Les molècules d'ADN es visualitzen tenyint el gel amb un agent fluorescent que s'intercala entre les bases d'ADN (Bromur d'etidi a una concentració final de 0.5 µg/mL) i transil·luminant amb llum UV.



M: Marcador

Fig 4. Gel d'agarosa on s'observen les dues bandes de la β -globina.

3.6.3 DETECCIÓ DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMÀ

Existeixen diferents metodologies per identificar el genotip del VPH. Dins d'aquestes tècniques es destaca la tècnica d'ELISA, la PCR i les tècniques d'hibridació com el Southern Blot. Recentment s'ha desenvolupat una metodologia més ràpida i senzilla per identificar els genotips del VPH a gran escala anomenada Reverse Line Blot (RLB). En aquest treball s'ha utilitzat aquest sistema de detecció per identificar els diferents tipus de VPH presents en mostres de pell psoriàsica. A grans trets la base de la tècnica es centra en l'ús d'un sistema de miniblotter. En una direcció dels carrils del miniblotter s'assagen sondes d'oligonucleòtids específics per diferents VPH. Posteriorment en direcció perpendicular s'assagen productes de PCR obtinguts de les extraccions d'ADN de les mostres utilitzant primers consens.

Mes concretament aquets primers consens permeten la detecció i tipatge de 24 tipus de beta i gamma-papilomavirus: VPH tipus 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 48, 49, 50, 60, i 65.

3.6.3.1 Disseny de *primers* consens

Els *primers* consens pels VPH que s'han utilitzat en aquest treball han estat dissenyats i obtinguts del grup d'Antoinette i col·laboradors (Brink, Lloveras et al. 2005). Aquests *primers* consens s'han dissenyat a partir d'una petita regió de 72 parells de bases codificat per un fragment molt conservat de l'ORF L1 (conté els gens que codifiquen la proteïna de la càpside L1) dels beta i gamma-papilomavirus. Les seqüències es van cercar a partir de la base de dades BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilitzant el genoma del VPH tipus 4 com a motlle. A partir de la superposició de 24 seqüències de VPHs obtingudes a la

cerca s'obtenen els primers consens (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Més concretament, pel disseny del *primer forward* s'utilitza la superposició de sis seqüències corresponents a la regió compresa entre les posicions 6539 i 6558 del genoma del VPH tipus 4. Per altra banda, pel disseny del *primer revers* s'utilitza la superposició de 8 seqüències dels genomes VPH alineats corresponents a la regió que va de la posició 6583 a 6610 del mateix genoma del VPH tipus 4. Aquests *primers* consens s'anomenen GP5+/6+ com ja hem comentat anteriorment.

Els *primers revers* han estat marcats amb biotina a l'extrem 3' per tal de permetre detectar el tipus de VPH de cada producte de PCR mitjançant el RLB.

3.6.3.2 Disseny de *primers* específics

Mitjançant els *primers* consens dissenyats a l'apartat anterior s'obtenen per PCR els beta i gamma-papilomavirus que es poden trobar en les extraccions d'ADN de les nostres mostres. Per fer un tipatge, o sigui, determinar quin tipus de VPH presenta cada una de les mostres que pugui presentar una amplificació per PCR, cal obtenir uns oligonucleòtids específics per cada un dels tipus de beta i gamma-papilomavirus. Per l'obtenció d'aquests oligonucleòtids que actuaran de sonda específica, s'ha partit de la mateixa regió conservada utilitzada pel disseny dels *primers* consens del genoma dels 24 tipus diferents de beta i gamma-papilomavirus (tipus 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 48, 49, 50, 60, i 65). A partir de cada una de les seqüències se n'ha obtingut els oligonucleòtids específics per cada tipus de VPH amb una temperatura de hibridació aproximada de 55°C i una llargada de 20 pb. Cada sonda d'oligonucleòtid presenta un grup amino a l'extrem 5' que permetrà unir la sonda de forma covalent a la membrana del miniblòtter.

3.6.3.3 Amplificació de l'ADN del VPH per mitjà de primers consens

A partir dels *primers* consens s'ha realitzat una PCR amb cada una de les extraccions de l'ADN de les mostres per tal de identificar la presència de beta i gamma-papilomavirus.

Protocol d'amplificació d'ADN per mitjà de PCR:

Les condicions de la reacció de PCR i les condicions del termociclador han estat les següents

Barreja de reacció

MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
dsDNA	10 µL
Oligo 3'	12,5 pmols
Oligo 5'	12,5 pmols
Ampli Taq Gold DNA	1 U

Programa termociclador

6 min. a 94°C desnaturalització inicial	
20 seg. a 94°C (desnaturalització)	} 40 cicles
30 seg. a 38°C (hibridació)	
80 seg. a 71°C (extensió)	
4 min. a 71°C (extensió final)	
Indefinidament a 4°C	

En les condicions de PCR es va utilitzar una temperatura d'hibridació molt baixa (38°C) per permetre cert grau de no complementarietat.

3.6.3.4 Tipatge amb Reverse Line Blot (RLB)

El RLB és sistema no radioactiu que permet amb un simple assaig l'estudi de la hibridació de múltiples mostres amb diferents sondes d'oligonucleòtids. El principi de la tècnica es basa amb la unió covalent a una membrana de les sondes d'oligonucleòtids específiques en línies paral·leles utilitzant un miniblotter. Posteriorment a la unió de les sondes d'oligonucleòtids la membrana es rota 90° en el miniblotter. Els carrils del miniblotter que es troben en perpendicular a les línies de les sondes d'oligonucleòtids, s'omplen amb els productes de PCR que estan marcats amb biotina. La hibridació que es dona en el miniblotter i es visualitza amb peroxidasa conjugada amb estreptavidina la qual s'uneix a la biotina dels productes de PCR. Seguidament es fa un revelat per quimioluminescència.

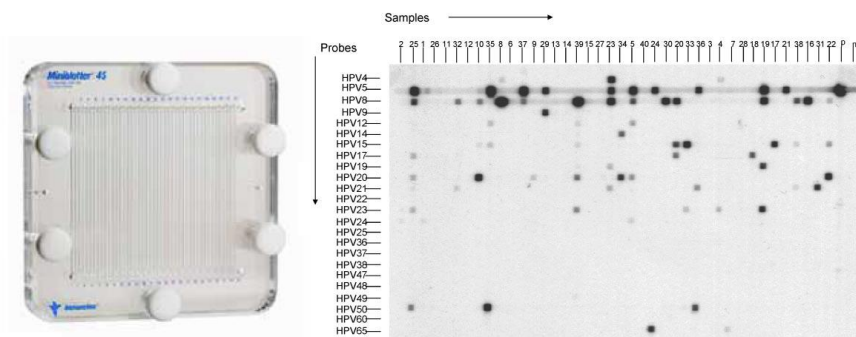


Fig 5. La imatge de l'esquerre correspon a un aparell de miniblotter 45 similar al que s'utilitzarà en el nostre assaig. La imatge de la dreta mostra un exemple d'un revelat de la membrana amb positivitat per a diferents tipus de beta-gamma papilomavirus en mostres de pell de pacients trasplantats renals (Brink, Lloveras et al. 2005).

Protocol:

1. Unió covalent de les sondes d'oligonucleòtids específics a la membrana.

Tal com s'ha comentat prèviament, tots els oligonucleòtids específics per cada tipus de VPH han estat sintetitzats amb un grup amino a l'extrem 5' terminal el qual permet la unió de l'oligonucleòtid de forma covalent a una membrana Biotin®C carregada negativament.

- a. Diluir les sondes d'oligonucleòtids específics a un rang de concentració òptim d'aproximadament 125pmols a 5000pmols en 150µL 500mM NaHCO₃ pH 8.4.
- b. Activació de la membrana Biotin®C mitjançant una incubació amb 16% de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) durant 10min a temperatura ambient. La solució d'EDAC es prepara amb aigua destil·lada i al moment de la seva utilització.
- c. Seguidament es fa un rentat de la membrana amb aigua destil·lada i es disposa sobre un suport esponjós dins del sistema miniblatter. Un cop preparada la membrana en el miniblatter s'extreuen les restes d'aigua dels carrils per espiració.
- d. Omplir els carrils amb 150µL de solució de sondes d'oligonucleòtids i incubar 1min a temperatura ambient.
- e. Aspirar la solució d'oligonucleòtid de cada carril amb el mateix ordre que s'ha aplicat.
- f. Amb molta cura treure la membrana del miniblatter i incubar-la en 100mM NaOH durant 8min amb agitació suau per inactivar la membrana.
- g. Rentar la membrana amb 250ml de 2xSSPE/0.1% SDS durant 5min a 60°C i realitzar una agitació suau.
- h. Fer un segon rentat amb 100ml de 20mM de EDTA a pH 8 durant 10min. En aquest punt la membrana es pot guardar a 4°C i està preparada per ser utilitzada per hibridar els oligos amb els productes de PCR marcats amb biotina.

2. Hibridació

- a. Els buffers que s'utilitzaran s'han de preescalfar.
 1. 250mL 2xSSPE/0.1% SDS, 60°C.
 2. 250mL 2xSSPE/0.5% SDS, 60°C.
 3. 250ml 2xSSPE, temperatura ambient.
- b. Diluir 20µL de cada producte de PCR obtingut en 150µL de 2xSSPE/0.1% SDS.
- c. Escalfar la dilució del producte de PCR a 99°C durant 10min i immediatament refredar en gel. En aquets punt es desnatura l'ADN per tal que pugui hibridar amb les sondes d'oligonucleòtids.
- d. Preparar la membrana amb un suport esponjós en el miniblatter de tal manera que els carrils del miniblatter quedin disposats en perpendicular a les línies d'aplicació del oligonucleòtids i aspirar les restes de fluid que puguin quedar a cada carril.

- e. Omplir cada carril amb les dilucions de producte de PCR preparades i desnaturalitzades prèviament i deixar hibridar amb les sondes durant 60min a 60°C. Evitar contaminacions entre carrils i la formació de bombolles d'aire.
- f. Treure les mostres del miniblatter per aspiració i amb molta cura treure la membrana.
- g. Fer dos rentats amb 250ml 2xSSPE/0.5% SDS a 60°C durant 10min. Finalment es deixarà que es vagi refredant la membrana per evitar una inactivació de la peroxidasa.
- h. Diluir 2.5µL de conjugat d'estreptavidina-peroxidasa en 10mL de 2xSSPE/0.5% SDS i incubar la membrana en aquesta solució de 45 a 60min a 42°C. En aquest punt es facilita la unió de l'estreptavidina amb la biotina dels productes de PCR.
- i. Es fan dos rentats nous amb 250ml 2xSSPE/0.5% SDS a 42°C durant 10min i seguidament es fan dos últims rentats amb 250mL de 2xSSPE durant 5min a temperatura ambient.

3. Revelat

- a. Pel revelat quimioluminiscent dels punts on hi ha hagut hibridació del producte de PCR amb les sondes d'oligonucleòtids s'incuba la membrana amb 20mL de solució reveladora durant 1min.
- b. Es cobreix la membrana amb una fulla de plàstic transparent i es deixa exposar amb una pel·lícula sensible a la llum durant 20min.

3.6.3.5 Sensibilitat i especificitat del RLB

En el procés de disseny i construcció del *primers* consens pel grup de Brink i col·laboradors es van realitzar assajos de sensibilitat i especificitat d'aquests sobre els diferents genomes de VPH. El terme sensibilitat fa referència al nombre de còpies de VPH que es poden identificar, mentres que l'especificitat es refereix a la capacitat d'identificar correctament un genotip específic de VPH. Més concretament i de forma breu, l'assaig de sensibilitat es va basar en la utilització dels genomes de varis tipus de VPH clonats en vectors de replicació els quals es van diluir amb ADN de placenta humana i es va dur a terme una PCR amb els *primers* consens. Una sèrie de dilucions dels productes de PCR es van analitzar per RLB tal com s'ha descrit anteriorment. Els resultats van mostrar una alta sensibilitat i especificitat de l'assaig. Cap de les proves dels VPH testats, incloent la prova del VPH9 el qual només té 2 *mismatches* o 2 punts de no aparellament amb el VPH15, va mostrar una hibridació creuada. La sensibilitat de l'assaig un cop realitzada la tècnica es va trobar entre 100ag/reacció (equivalent a 10 còpies de genoma de VPH/reacció de PCR) i 10fg/reacció (equivalent a 1000 còpies de genoma de VPH/reacció de PCR) depenent del tipus de VPH (Brink, Lloveras et al. 2005).

3.6.3.6 Reproductibilitat del RLB

Es van realitzar fins a 3 assajos addicionals amb les diferents dilucions dels genomes de VPH. El resultat dels test pel que fa a sensibilitat i especificitat van ser els mateixos en totes les ocasions.

3.7 VARIABLES PRINCIPALS DE L'ESTUDI.

3.7.1 Variables dependents (VD)

Expressió de VPH (qualitativa).

Quantificació dels subtipus de VPH (quantitativa).

3.7.2 Variables independents (VI)

Edat (quantitativa).

Sexe (qualitativa).

Psoriasi familiar o esporàdica (qualitativa).

Localització de la biòpsia (qualitativa).

3. 8 RECOLLIDA DE DADES.

Les dades es recullen en una base de dades i s'analitzen amb el paquet estadístic SPSS v15.0.

3. 9 ANÀLISI ESTADÍSTIC.

Es realitzarà un anàlisi d'estadístic descriptiu per totes les variables. Les variables quantitatives es resumiran amb mesures de posició o tendència central (mitja, mediana, moda i percentils) i de dispersió (desviació estàndard, valors extrems i rang). Per les variables qualitatives s'utilitzaran taules de freqüència i percentatges sobre el total de respostes avaluades. En tots els casos els intervals de confiança aplicats seran del 95% (IC 95%).

Per la comparació i estudi d'associació es considerarà un nivell de significació estadística de 0,05 ($p < 0,05$). La diferència entre els dos grups d'estudi s'analitzarà per mitjà de la prova chi-quadrat ja que es tracta de dues variables de tipus qualitatiu.

4. *RESULTATS*

4. RESULTATS

Hem realitzat un estudi de detecció de beta i gamma-papilomavirus en un total de 60 biòpsies cutànies. 30 corresponen a pacients afectats de psoriasi vulgar (casos) i s'han obtingut de l'àrea afectada; i 30 corresponen a pacients no afectats de psoriasi sotmesos a cirurgia dermatològica (controls) i s'han obtingut de pell sana de les orelletes sobrants de la reconstrucció quirúrgica.

4.1 Estudi descriptiu de la mostra estudiada

Pel que fa als casos un 70% de la mostra són homes i un 30% dones. L'edat mitja és de 58 anys. La biòpsia cutània es localitza a nivell de l'extremitat inferior en un 36,7% dels casos, a l'extremitat superior en un 23,3%, i al tronc en un 40%. Un 90% dels casos presenten una psoriasi de tipus esporàdic i un 10% de tipus familiar.

En el cas dels controls un 50% de la mostra són homes i un 50% dones. L'edat mitja és de 74 anys. La biòpsia cutània es localitza a nivell del cap en un 69,9% dels controls, a nivell de l'extremitat inferior en un 10%, a l'extremitat superior en un 3,3% i en el tronc en un 16,7%.

4.2 Estudi de la qualitat de l'ADN extret de les biòpsies cutànies

Seguidament s'ha procedit a l'extracció de l'ADN de les biòpsies cutànies parafinades per mitjà del quit QIAmp® DNA FFPE Tissue i s'ha realitzat una PCR de la β -globina per testar la qualitat d'aquest. El 100% mostres incloses en el nostre estudi han presentat una positivitat per a la β -globina demostrant així la presència d'ADN amplificable.

4.3 Estudi del tipatge de VPH per mitjà de Reverse Line Blot

Posteriorment hem realitzat l'amplificació de l'ADN extret de les biòpsies cutànies mitjançant PCR amb *primers* consens per a la detecció de beta i gamma-papilomavirus. El resultat de l'amplificació ha estat sotmès a un tipatge de VPH mitjançant el Reverse Line Blot. Aquest últim procés ha estat realitzat en 3 ocasions.

Dins el grup de pacients amb psoriasi s'han detectat 4 casos amb positivitat pel VPH. Els subtipus detectats corresponen al VPH9 en 2 casos, al VPH4 en 1 cas i al VPH23 en 1 cas. Aquests s'han demostrat positius en els 3 assajos realitzats.

Dins el grup de subjectes sans no s'ha detectat cap tipus de VPH.

Cal destacar també l'absència de troballa de VPH5 o VPH36 en les biòpsies de pell psoriàsica.

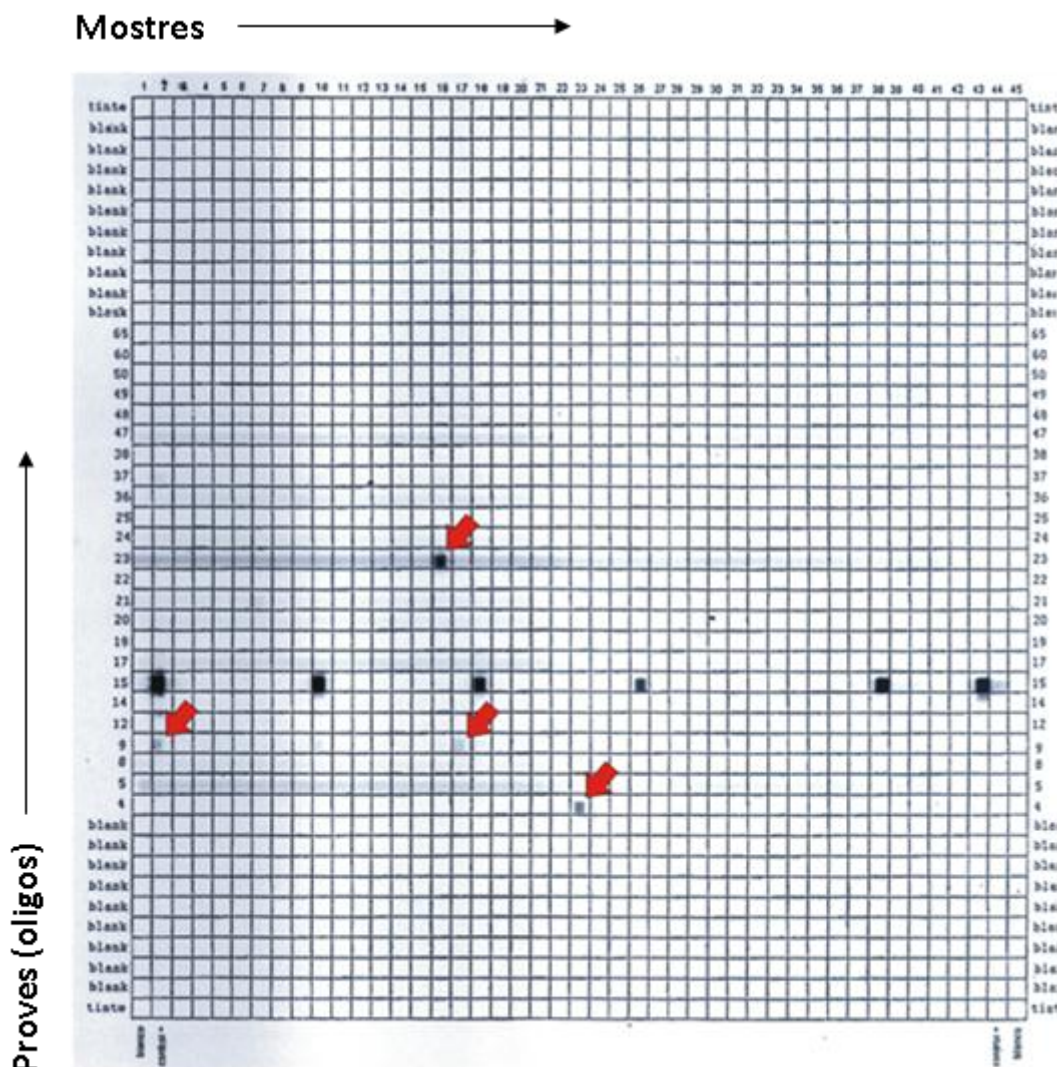


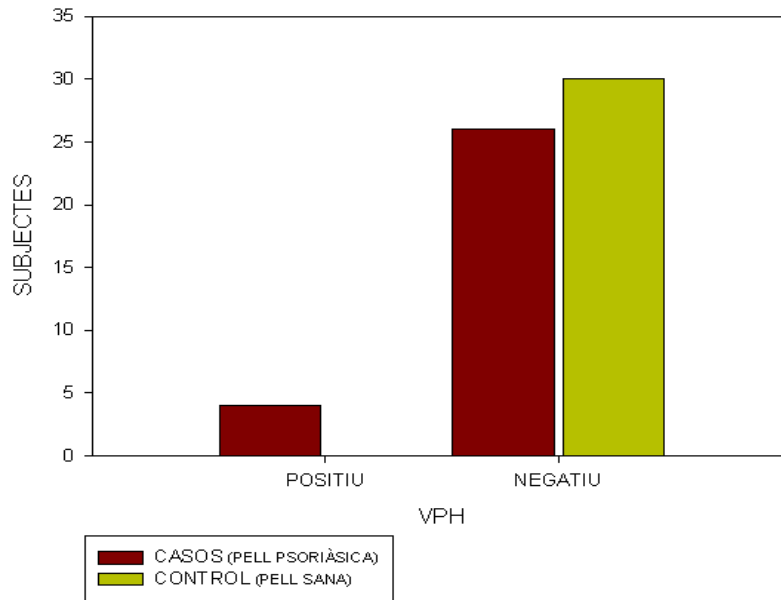
Fig 6. Imatge de la membrana del RBL on es mostra la positivitats dels VPH23, 9 i 4 de les mostres de pacients psoriàsics (senyalades per mitjà de fletxes). S'ha utilitzat el VPH15 com a control positiu.

4.5 Anàlisi estadístic dels resultats

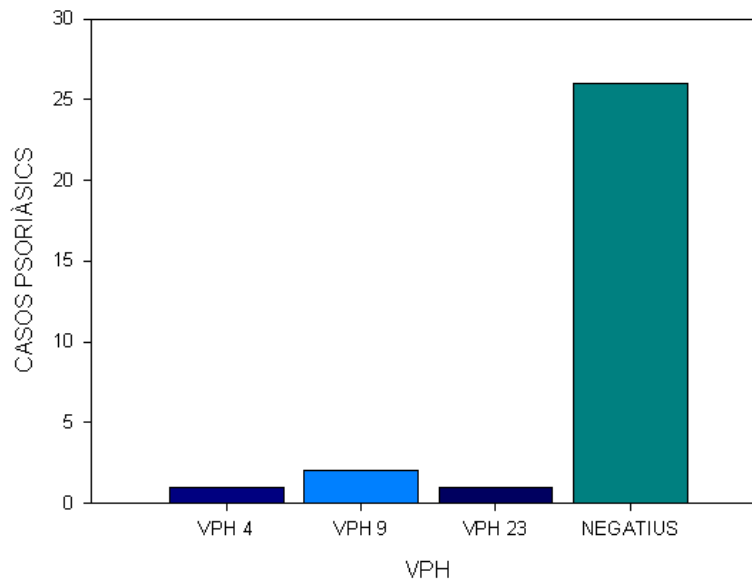
Dins el grup de pacients amb psoriasi s'han detectat 4 casos amb positivitats pel VPH, el que representa un 13,33% del total de casos. Els 26 pacients restants no presentaven positivitats per cap tipus VPH, el que representa un 86,67% del total dels casos.

Com ja hem comentat anteriorment, els VPH detectats corresponen al VPH9 en 2 casos, al VPH4 en 1 cas i al VPH23 en 1 cas. Dins el grup de subjectes sans no s'ha detectat cap tipus de VPH. El VPH4 està inclòs dins el grup dels gamma-papilomavirus i el VPH9 i 23 estan inclosos

dins el grup dels beta-papilomavirus. Els gamma-papilomavirus es troben presents en el 3,33% dels pacients afectats de psoriasi i els beta-papilomavirus en el 10%. Existeix un representació més important dels beta-papilomavirus respecte als gamma-papilomavirus, però tot i això la seva prevalença en les mostres de psoriasi és baixa.



Gràfica 1. Comparació entre casos i controls pel que fa a detecció de VPH.



Gràfica 2. Quantificació dels subtipus detectats de VPH en les mostres psoriàsiques.

Les prevalences de detecció de VPH són molt baixes en els pacients amb psoriasi i nul·la en els subjectes sans. No podem realitzar un càlcul de la odds ratio (OR) o raó de productes creuats ja que no es detecta cap VPH positiu en els controls. Per tant, ens altres paraules, no podem quantificar l'associació entre la presència de VPH i el fet de patir una psoriasi.

Taula II. Taula de contingència.

	Casos (pell psoriàsica)	Controls (pell no psoriàsica)	Total
Presència de VPH	4 (a)	0 (b)	4
Absència de VPH	26 (c)	30 (d)	56
Total	30	30	60

$$OR = a \cdot d / b \cdot c = 4 \cdot 30 / 0 \cdot 26 = 120 / 0 = \text{error}.$$

Calculant el valor de la Chi-quadrat amb la correcció per continuïtat el valor de la p és de 0,112. Obtenim uns resultats no significatius ja que havíem acceptat prèviament un nivell de significació estadística inferior a 0,05 ($p < 0,05$). El valor de la p que hem obtingut ens demostra que l'atzar no pot ser exclòs com a explicació d'aquests resultats, i per tant, no podem rebutjar la H_0 que afirma que la prevalença de VPH en pell psoriàsica i pell normal són similars.

5. DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

La psoriasi és una dermatosi inflamatòria crònica i recidivant que es presenta en un 1,4% de la població espanyola (Ferrándiz, Pujol et al. 2002). Tot i que no es coneix amb exactitud la causa de la psoriasi sí que podem afirmar que en la seva etiopatogènia hi intervé una genètica complexa i un fenomen immunològic afavorits per una sèrie de factors ambientals desencadenants.

Els estudis de població indiquen que la psoriasi tendeix a l'agrupació familiar. Probablement existeix una gran variabilitat genètica de la malaltia, en algunes famílies podria heredar-se de forma mendeliana tractant-se d'una malaltia monogènica, mentre que en la majoria dels casos es produiria com a resultat de la interacció de múltiples gens. S'han identificat almenys 9 loci amb lligament genètic significatiu amb la psoriasi els quals es denominen PSORS1-9 (Liu, Krueger et al. 2007).

La psoriasi es tracta d'una malaltia mediada immunològicament per limfòcits T. La naturalesa de l'antigen responsable de l'activació de la cascada immunològica és un tema de controvèrsia.

S'ha descrit en nombrosos articles a la bibliografia una elevada prevalença de beta-papilomavirus en pacients amb psoriasi, sobretot el VPH5 i el 36, suggerint que aquests virus podrien correspondre a aquest antigen causal. Majewski i col·laboradors van proposar un model on les proteïnes de la càpside del VPH contribueixen a la proliferació epidèrmica servint com a potencials antígens reconeguts pels limfòcits B i T autoreactius (Majewski, Favre et al. 1998).

Els Papilomavirus pertanyen a la família Papillomaviridae, família de virus d'ADN amb simetria icosaèdrica, genoma circular i que careixen d'envoltura. Una classificació recent dels Papilomavirus els divideixen en 3 grups importants: el supergrup A, el supergrup B i el supergrup E. Dins el supergrup B trobem els virus del subgrup B1, com el VPH5 (també coneguts com Beta-papilomavirus), els quals causen lesions inaparents o latents a la població general, encara que poden arribar a ser un problema en individus immunodeprimits i en individus amb defectes hereditaris. Per contrast, els virus del subgrup B2, com el VPH4 (també coneguts com Gamma-papilomavirus) només causen berrugues cutànies a la població general (de Villiers, Fauquet et al. 2004).

En el nostre estudi, on hem realitzat la detecció tant de beta com gamma-papilomavirus de 30 biòpsies de pell amb psoriasi i 30 biòpsies de pell sana, hem observat una baixa prevalença de VPH en els pacients amb psoriasi i nul·la en els subjectes sans. Els casos presentaven una prevalença de VPH del 13,33% i els controls del 0%. Els VPH detectats en els pacients amb psoriasi són el VPH9 en 2 casos, el VPH4 en 1 cas i el VPH23 en 1 cas. Per tant, els gamma-papilomavirus es troben presents en el 3,33% dels pacients afectats de psoriasi i els beta-papilomavirus en el 10%.

Amb els resultats obtinguts no podem afirmar que la psoriasi presenti una prevalença més elevada de detecció de VPH en comparació amb la població sana. El valor de la p que hem obtingut ($p=0,112$) ens demostra que l'atzar no pot ser exclòs com a explicació d'aquests resultats, i per tant, no podem rebutjar la H_0 que afirma que la prevalença de VPH en pell psoriàsica i pell normal són similars.

Per poder afirmar que aquests resultats obtinguts no són deguts a l'atzar, és a dir, per obtenir uns resultats estadísticament significatius, hauríem d'augmentar la potència del test, la qual cosa s'aconsegueix realitzant l'estudi amb un tamany mostral més gran al que hem utilitzat en el present assaig. Per tant, es podria considerar que una segona fase del treball d'investigació consistiria en la selecció de més casos i més controls, tenint en compte que això augmenta el cost de l'estudi.

Però no es pot passar per alt que no s'ha observat cap VPH en els pacients sans i sí en els pacients afectats per psoriasi, que tot i no tractar-se de resultats significatius estadísticament sí que poden tenir certa rellevància. Remarcant també la troballa més freqüent de beta-papilomavirus que gamma-papilomavirus a nivell de la pell psoriàsica.

Cal esmentar que no hem observat la presència de VPH5 o VPH36 en cap de les 30 biòpsies cutànies de pell psoriàsica, beta-papilomavirus que han estat freqüentment detectats en altres estudis en malalts psoriàsics.

El nostre estudi ens fan arribar a les mateixes conclusions que Viviano E i col·laboradors. Observen una prevalença de VPH del 71% en les mostres psoriàsiques i del 58,3% en les mostres de pell sana. El percentatge de detecció del VPH no difereix de forma significativa entre el grup psoriàsic i el grup control. Conclouen que es tracta d'un virus amb presència ubiqua tant en pell sana com afectada i que no té un paper com a factor causal de la psoriasi. Els autors també destaquen la baixa prevalença del VPH5 en els casos psoriàsics, només del 7,4%, i l'absència de detecció del VPH36 en les mostres analitzades com el nostre cas (Viviano, Giovannelli et al. 2007).

Altres autors també han demostrat l'ubiquïtat d'aquest virus realitzant la seva detecció en pell sana. És el cas de Antonsson A i col·laboradors que demostren que la infecció del VPH té una distribució mundial amb un gran espectre de genotips. Estudien fins a 5 poblacions diferents. La prevalença de VPH a Bangladesh és del 68%, a Japó del 54%, a Etiòpia del 52%, a Zàmbia del 42% i a Suècia del 70%. Una gran multiplicitat de genotips són detectats amb la troballa de 88 tipus diferents de VPH en 142 mostres positives per ADN de VPH. En aquest cas sí que el VPH més prevalent és el VPH5 amb una prevalença total del 6,5% (Antonsson, Erfurt et al. 2003).

Però ja hem esmentat la gran contrarietat de resultats dels estudis publicats a la bibliografia pel que fa a la detecció de beta-papilomavirus. Múltiples autors aporten prevalences elevades de virus de l'Epidermodisplasia verruciforme en pell psoriàsica comparada amb pell sana amb resultats significatius. Fins i tot demostren la predominança de determinats virus com el VPH5 i 36.

És el cas de Favre i col·laboradors els quals detecten ADN del VPH en el 91,7% de les biòpsies de pell de pacients amb psoriasi comparat amb el 35,5% de les biòpsies de pell de pacients amb dermatitis atòpica. Les prevalences del VPH5, VPH36, i VPH1 en les mostres dels pacients amb psoriasi eren de 89,4%; 84,2% i 42,1% respectivament (Favre, Orth et al. 1998).

Sonke J Weissenborn i col·laboradors detecten VPH en el 83% de les mostres psoriàsiques i en el 19% de les mostres de pell sana. Els tipus de VPH més prevalents en els pacients amb psoriasi van correspondre al VPH36 en un 62% dels casos, al VPH5 en el 38% dels casos i al VPH38 en el 24% dels casos (Weissenborn, Hopfl et al. 1999).

Mahé E i col·laboradors demostren altes prevalences de beta-papilomavirus en els subjectes afectats per psoriasi: un 38,5% dels nens i un 35,7% dels adults, en comparació amb els subjectes controls: un 6,7% dels nens i un 10,1% dels adults. El VPH5 es detecta en el 46,2% dels nens afectats per psoriasi i en el 46,4% dels adults afectats per psoriasi. El VPH36 es detecta en el 15,4% i el 25% de nens i adults afectats per psoriasi respectivament (Mahe, Bodemer et al. 2003).

Prignano G i col·laboradors observen una alta prevalença de VPH5 (74,1%) en les àrees afectades per psoriasi i una disminució de la prevalença (33,3%) en les àrees no afectades per psoriasi, comparat amb un 0% en subjectes sans i un 3,6% en àrees lesionals de pacients amb altres patologies inflamatòries (Prignano, Ferraro et al. 2005).

Simeone P i col·laboradors detecten VPH5 en el 64% del total de biòpsies de pell psoriàsica i no observen cap VPH a les biòpsies realitzades en pell sana (Simeone, Teson et al. 2005).

Cronin JC i col·laboradors observen que la prevalença del VPH en les cel·les i en la pell dels pacients amb psoriasi és més elevada que en els controls, 83,3% vs 46,7% respectivament. Aquests autors són els primers a estudiar la prevalença tant de beta com gamma-papilomavirus en les mostres cutànies. Els beta-papilomavirus són detectats en el 96,7% dels casos amb psoriasi amb positivitat pel VPH i en el 90,5% dels controls sans amb positivitat pel VPH. Els gamma-papilomavirus són detectats en el 6,78% dels casos positius pel VPH i en el 9,5% dels controls positius pel VPH. Observen un percentatge més elevat de detecció de beta-papilomavirus que de gamma-papilomavirus en pell psoriàsica sense destacar el paper del VPH5 i 36 com en el nostre cas (Cronin, Mesher et al. 2008).

A continuació presentem una taula comparativa dels diferents estudis de detecció del VPH juntament amb els resultats del nostre estudi.

Taula III. Estudi comparatiu de detecció de VPH entre els diferents estudis presentats a la bibliografia:

Autors	Casos VPH+ (%)	Controls VPH+ (%)	VPH més freqüents en els casos
Favre, Orth et al. 1998	91,7	35	VPH5, VPH36, VPH1
Weissenborn, Hopfl et al. 1999	83	19	VPH5, VPH36, VPH38
Mahé, Bodemer et al. 2003	38,5 (nens) 35,7 (adults)	6,7 (nens) 10,1 (adults)	VPH5, VPH36
Prignano, Ferraro et al. 2004	74,1 (àrea afectada) 33,3 (àrea no afectada)	0 (sans) 3,6% (altres pat. Inflamatòries)	VPH5
Simeone, Teson et al. 2005	64	0	VPH5
Viviano, Giovannelli et al. 2007	71	58,3	VPH4
Cronin, Mesher et al. 2008	83,3	46,7	VPH5, VPH21, VPH14
El nostre estudi	13,33	0	VPH9 (2), VPH4 i 23 (1)

Aquests resultats contradictoris presentats a la bibliografia es podrien explicar per diferents motius. Per una banda tenim la diversitat de la procedència, tipus i localització de les mostres analitzades i, per l'altre, la utilització per part dels investigadors de diferents mètodes de detecció de papilomavirus.

Pel que fa a la procedència de les mostres estudiades observem que aquestes provenen de diverses poblacions en les quals la prevalença del VPH pot ser diferent, com ja s'ha demostrat en estudis poblacionals de detecció del VPH (Antonsson, Erfurt et al. 2003). La majoria dels

estudis utilitzen biòpsies cutànies per a la detecció dels VPH però també s'han utilitzat escames cutànies i fol·licles pilosos del cuir pilós o de les celles. De la mateixa manera que les mostres cutànies no s'obtenen sempre de la mateixa localització en tots els estudis. També cal destacar que moltes vegades els controls no corresponen exactament a individus sans sinó que presenten altres dermatosis inflamatòries com una dermatitis atòpica. O bé no es compara amb individus sans sinó amb la pell sana del mateix pacient afectat de psoriasi. Cal esmentar el biaix de confusió en molts articles per la inclusió de pacients amb psoriasi tractats prèviament amb agents immunosupressors tòpics o sistèmics o fototeràpia, modalitats terapèutiques que poden afavorir la infecció pel VPH segons alguns autors (Wolf, Seidl et al. 2004).

Però el principal problema a tenir en compte correspondria a l'ús de diferents tècniques de detecció del VPH. La majoria dels estudis utilitzen la tècnica de PCR amb *primers* consens per a la detecció de beta-papilomavirus i, posteriorment, utilitzen *primers* específics i determinen el subtipus de VPH. Cal tenir en compte que no en tots els estudis han utilitzat els mateixos primers consens (GP5+/6+ o MGY09/11) i que posteriorment només han identificat certs subtipus de VPH, sobretot el 5 i el 36, a causa de la utilització de *primers* específics només per aquests tipus determinats de beta-papilomavirus. Aquests fets poden causar variacions respecte a la detecció de VPH entre els diferents estudis. Cal destacar també que en la majoria dels assajos només intenten la detecció de beta-papilomavirus impossibilitant l'observació d'altres papilomavirus com els gamma produint així un biaix d'informació. Només l'estudi de Cronin i col·laboradors realitzen la detecció tant de beta com gamma-papilomavirus com a novetat (Cronin, Mesher et al. 2008). Altres autors han optat per la utilització de tècniques serològiques com la detecció d'anticossos contra proteïnes de la càpside específiques del VPH5 impossibilitant encara més la detecció d'altres papilomavirus coexistents. Seria necessària la utilització d'una mateixa tècnica consensuada per poder realitzar un estudi comparatiu entre els assajos aportats a la bibliografia.

Si comparem el nostre assaig amb la resta d'estudis publicats (Taula III) podem observar com nosaltres obtenim un percentatge més baix de detecció de VPH en pacients afectats de psoriasi. Com ja he comentat anteriorment s'han aportat a la bibliografia percentatges de detecció que van del 64 al 83,3% en les mostres psoriàsiques. Fins i tot, observem com en alguns estudis els percentatges de detecció de VPH en pell sana també són elevats arribant fins a un 58,3% dels casos. Aquesta diferència de detecció és difícil de interpretar ja que el 100% de

les nostres mostres presentaven un positivitat per a la β -globina i, per tant ADN amplificable, i podria ser motivada pels diferents passos que s'han de dur a terme durant el procés tècnic de detecció.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

Les conclusions que obtindríem del nostre estudi són les següents:

1. Existeix una baixa prevalença de VPH en individus psoriàsics i en individus sans. Únicament obtenim un percentatge de detecció del VPH del 13,33% en el total dels casos i un 0% en el total dels controls.
2. Els beta-papilomavirus (VPH9 i VPH23) presenten una prevalença superior respecte els gamma-papilomavirus (VPH4) en la pell psoriàsica, un 10% i un 3,33% del total de casos respectivament.
3. El VPH5 i VPH36 no són detectats en cap de les biòpsies cutànies realitzades en els pacients psoriàsics. Aquests tipus específics de beta-papilomavirus poden no tenir un rol causant tant important a nivell de la psoriasi com s'ha publicat anteriorment.
4. Donat que el valor de la p no ha resultat significatiu estadísticament ($p > 0,05$) arribem a la conclusió que l'atzar no pot ser exclòs com a explicació d'aquests resultats, i per tant, acceptem la hipòtesi nul·la que afirma que la prevalença de VPH en pell psoriàsica i pell normal són similars. Així doncs, el VPH podria no tenir un paper etiopatogènic a la psoriasi.
5. Per obtenir resultats estadísticament significatius caldria augmentar la potència del test, i per tant, incloure més subjectes en el tamany mostral. Això podria correspondre a una segona fase de l'estudi.
6. Existeix gran controvèrsia a nivell de la bibliografia pel que fa a percentatges de detecció del VPH. Estudis demostren un augment de la prevalença de VPH en pell psoriàsica respecte a pell sana de forma significativa mentre que altres autors demostren una presència similar en pell psoriàsica i en pell sana. Aquesta disparitat de resultats podria ser causada per la diversitat de la procedència de les mostres

analitzades i pels diferents mètodes de detecció utilitzats pels investigadors. Tots aquests fets dificultarien la comparació entre els diferents estudis.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Allen, M. H., H. Ameen, et al. (2005). "The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis." J Invest Dermatol **124**(1): 103-6.
- Andressen, C. and T. Henseler (1982). "[Inheritance of psoriasis. Analysis of 2035 family histories]." Hautarzt **33**(4): 214-7.
- Antonsson, A., C. Erfurt, et al. (2003). "Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents." J Gen Virol **84**(Pt 7): 1881-6.
- Ashcroft, D. M., A. L. Po, et al. (2000). "Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis." BMJ **320**(7240): 963-7.
- Baker, H. and T. J. Ryan (1968). "Generalized pustular psoriasis. A clinical and epidemiological study of 104 cases." Br J Dermatol **80**(12): 771-93.
- Bernard, H. U. (2005). "The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses." J Clin Virol **32 Suppl 1**: S1-6.
- Bernard, H. U., S. Y. Chan, et al. (1994). "Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms." J Infect Dis **170**(5): 1077-85.
- Boxman, I. L., L. H. Mulder, et al. (1999). "Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals." Br J Dermatol **141**(2): 246-9.
- Brink, A. A., B. Lloveras, et al. (2005). "Development of a general-primer-PCR-reverse-line-blotting system for detection of beta and gamma cutaneous human papillomaviruses." J Clin Microbiol **43**(11): 5581-7.
- Burch, P. R. and N. R. Rowell (1981). "Mode of inheritance in psoriasis." Arch Dermatol **117**(5): 251-2.
- Cameron, H., R. S. Dawe, et al. (2002). "A randomized, observer-blinded trial of twice vs. three times weekly narrowband ultraviolet B phototherapy for chronic plaque psoriasis." Br J Dermatol **147**(5): 973-8.
- Cao, J., Y. X. Zhang, et al. (2001). "[Advances in molecular biological study of HPV infection and oral cancer]." Shanghai Kou Qiang Yi Xue **10**(3): 273-5.
- Capon, F., R. C. Trembath, et al. (2004). "An update on the genetics of psoriasis." Dermatol Clin **22**(4): 339-47, vii.
- Casanova, J.M., Marti, R.M., Baradad, M. (2004). "Tratamiento tópico de la psoriasis." Clínicas Dermatológicas de la AEDV **2**: 118-48.
- Cronin, J. G., D. Mesher, et al. (2008). "Beta-papillomaviruses and psoriasis: an intra-patient comparison of human papillomavirus carriage in skin and hair." Br J Dermatol **159**(1): 113-9.
- Chandraratna, R. A. (1997). "Tazarotene: the first receptor-selective topical retinoid for the treatment of psoriasis." J Am Acad Dermatol **37**(2 Pt 3): S12-7.
- Christophers, E. (2001). "Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum." Clin Exp Dermatol **26**(4): 314-20.

- De Cesare, A., Di Meglio, P., et al (2009). "The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis." J Invest Dermatol **129** (6): 1339-50.
- De Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.
- De Villiers, E.M., Ruhland, A. (2001). "Do specific human papillomavirus types cause psoriasis?." Arch Dermatol **137**(3): 384.
- Farber, E. M., M. L. Nall, et al. (1974). "Natural history of psoriasis in 61 twin pairs." Arch Dermatol **109**(2): 207-11.
- Favre, M., S. Majewski, et al. (2000). "Antibodies to human papillomavirus type 5 are generated in epidermal repair processes." J Invest Dermatol **114**(3): 403-7.
- Favre, M., G. Orth, et al. (1998). "Psoriasis: A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis." J Invest Dermatol **110**(4): 311-7.
- Ferrándiz, C., Hernánz, J.M. (2000). "Documento de consenso Español para el uso de ciclosporina." Actas Dermosifiliogr **91**: 357-64.
- Ferrandiz, C., R. M. Pujol, et al. (2002). "Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain." J Am Acad Dermatol **46**(6): 867-73.
- Finlay, A. Y. and G. K. Khan (1994). "Dermatology Life Quality Index (DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use." Clin Exp Dermatol **19**(3): 210-6.
- Finlay, A.Y. and Coles, E.C. (1995). "The effects of severe psoriasis on the quality of life of 369 patients." Br J Dermatol **132**: 236-244.
- Fisher, T. (1976). "UV-light treatment of psoriasis." Acta Derm Venereol **56**: 473-9.
- Fredriksson, T. and U. Pettersson (1978). "Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid." Dermatologica **157**(4): 238-44.
- Freeman, K. and A. P. Warin (1984). "Deterioration of liver function during PUVA therapy." Photodermatol **1**(3): 147-8.
- Gravitt, P. E., C. L. Peyton, et al. (2000). "Improved amplification of genital human papillomaviruses." J Clin Microbiol **38**(1): 357-61.
- Griffiths, C. E. and J. N. Barker (2007). "Pathogenesis and clinical features of psoriasis." Lancet **370**(9583): 263-71.
- Gudjonsson, J. E. and J. T. Elder (2007). "Psoriasis: epidemiology." Clin Dermatol **25**(6): 535-46.
- Gupta, M.A., and Gupta, A.K. (1998). "Depression and suicidal ideation in dermatology patients." Br J Dermatol **39**: 846-50.
- Henseler, T. and E. Christophers (1985). "Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris." J Am Acad Dermatol **13**(3): 450-6.
- Iftner, T. and L. L. Villa (2003). "Chapter 12: Human papillomavirus technologies." J Natl Cancer Inst Monogr(31): 80-8.
- Isom, H.C., Wigdahl, B., Howett, M.K. (1990). "Molecular pathology of human oncogenic viruses. Celular and molecular pathogenesis." Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. pp 342-388.

- Jacobs, M. V., P. J. Snijders, et al. (1997). "A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings." J Clin Microbiol **35**(3): 791-5.
- Jones-Caballero, M. and Peñas, M.P. (2002). "Calidad de vida (I). Generalidades." Actas Dermosifiliogr **93**: 421-31.
- Jordan, W. P., Jr., A. M. Clarke, et al. (1981). "Long-term modified Goeckerman regimen for psoriasis using an ultraviolet B light source in the home." J Am Acad Dermatol **4**(5): 584-91.
- Jenisch, S., Hampe, J., Elder, J.T., Nair, R., Stuart, P., Voorhees, J.J., et al. (2006). "CARD15 mutations in patients with plaque-type psoriasis and psoriatic arthritis: lack of association". Arch Dermatol Res **297**: 409-11.
- Kanerva, L., J. Lauharanta, et al. (1982). "Light and electron microscopy of psoriatic skin before and during retinoid (Ro 10-9359) and retinoid-PUVA treatment." J Cutan Pathol **9**(3): 175-88.
- Kaur, I., A. Saraswat, et al. (2001). "Nail changes in psoriasis: a study of 167 patients." Int J Dermatol **40**(9): 601-3.
- Kleter, B., L. J. van Doorn, et al. (1998). "Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses." Am J Pathol **153**(6): 1731-9.
- Koutsky, L. A., K. A. Ault, et al. (2002). "A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine." N Engl J Med **347**(21): 1645-51.
- Kragballe, K., Gjertsen, B.T., de Hoope, D. (1991). "Double-blind, right-left comparison of calcipotriol and bethametasone valerate in treatment of psoriasis vulgaris." Lancet **337**: 193-6.
- Krueger, G.G., Langley, R.G., Leonardi, C., Teilding, N., Guzzo, C., Wang, Y. et al. (2007). "CNTO 1275 Psoriasis Study Group. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis." N Engl J Med **356**: 580-92.
- Krueger, J.G. (2002). "Treating psoriasis with biologic agents." Science & Medicine **8**: 150-61.
- Kumar, B., R. Kumar, et al. (1997). "Coal tar therapy in palmoplantar psoriasis: old wine in an old bottle?" Int J Dermatol **36**(4): 309-12.
- Lehtinen, M., M. Pawlita, et al. (2003). "Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later." Am J Obstet Gynecol **188**(1): 49-55.
- Liu, Y., J. G. Krueger, et al. (2007). "Psoriasis: genetic associations and immune system changes." Genes Immun **8**(1): 1-12.
- Lörinez, A., Anthony, J. (2001). "Advances in HPV detection by hybrid capture." Virus Res **53**: 145-54.
- Mahe, E., C. Bodemer, et al. (2003). "High frequency of detection of human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis in children with psoriasis." Br J Dermatol **149**(4): 819-25.
- Majewski, S., Favre, M., et al. (1998). "Is human papillomavirus type 5 the putative autoantigen involved in psoriasis?" J Invest Dermatol **111**(1): 123-7.

- Majewski, S., Jablonska, S., Favre, M., et al. (1999). "Papillomavirus and autoimmunity in psoriasis." *Immunol Today* **20** (10): 475-6.
- Moll, J. M. and V. Wright (1973). "Psoriatic arthritis." *Semin Arthritis Rheum* **3**(1): 55-78.
- Morison, W. L., S. Marwaha, et al. (1997). "PUVA-induced phototoxicity: incidence and causes." *J Am Acad Dermatol* **36**(2 Pt 1): 183-5.
- Munger, K. and P. M. Howley (2002). "Human papillomavirus immortalization and transformation functions." *Virus Res* **89**(2): 213-28.
- Nair, R. P., P. E. Stuart, et al. (2006). "Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene." *Am J Hum Genet* **78**(5): 827-51.
- Nijsten, T. E. and R. S. Stern (2003). "The increased risk of skin cancer is persistent after discontinuation of psoralen+ultraviolet A: a cohort study." *J Invest Dermatol* **121**(2): 252-8.
- Palazzi, C., E. Lubrano, et al. "Beyond early diagnosis: occult psoriatic arthritis." *J Rheumatol* **37**(8): 1556-8.
- Park, B. S. and J. I. Youn (1998). "Factors influencing psoriasis: an analysis based upon the extent of involvement and clinical type." *J Dermatol* **25**(2): 97-102.
- Pastrana, D. V., C. B. Buck, et al. (2004). "Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18." *Virology* **321**(2): 205-16.
- Peyton, C. L., M. Schiffman, et al. (1998). "Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies." *J Clin Microbiol* **36**(11): 3248-54.
- Pinkus, H. and A. H. Mehregan (1966). "The primary histologic lesion of seborrheic dermatitis and psoriasis." *J Invest Dermatol* **46**(1): 109-16.
- Poikolainen, K., T. Reunala, et al. (1994). "Smoking, alcohol and life events related to psoriasis among women." *Br J Dermatol* **130**(4): 473-7.
- Poikolainen, K., T. Reunala, et al. (1990). "Alcohol intake: a risk factor for psoriasis in young and middle aged men?" *BMJ* **300**(6727): 780-3.
- Prignano, G., C. Ferraro, et al. (2005). "Prevalence of human papilloma virus type 5 DNA in lesional and non-lesional skin scales of Italian plaque-type psoriatic patients: association with disease severity." *Clin Microbiol Infect* **11**(1): 47-51.
- Roenigk, H. H., Jr., R. Auerbach, et al. (1998). "Methotrexate in psoriasis: consensus conference." *J Am Acad Dermatol* **38**(3): 478-85.
- Ross, J. B. and J. Guptill (1982). "Treatment of psoriasis with the Ingram anthralin paste regimen." *Can Med Assoc J* **126**(5): 496.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Schiller, J. T. (1999). "Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer." *Mol Med Today* **5**(5): 209-15.
- Schmid, M. H. and H. C. Korting (1996). "Coal tar, pine tar and sulfonated shale oil preparations: comparative activity, efficacy and safety." *Dermatology* **193**(1): 1-5.

- Simeone, P., M. Teson, et al. (2005). "Human papillomavirus type 5 in primary keratinocytes from psoriatic skin." Exp Dermatol **14**(11): 824-9.
- Smith, A. E., J. Y. Kassab, et al. (1993). "Bimodality in age of onset of psoriasis, in both patients and their relatives." Dermatology **186**(3): 181-6.
- Smotkin, D. (1989). "Virology of human papillomavirus." Clin Obstet Gynecol **32**(1): 117-26.
- Telfer, N. R., R. J. Chalmers, et al. (1992). "The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis." Arch Dermatol **128**(1): 39-42.
- Van de Kerkhof, P. C. (2001). "Therapeutic strategies: rotational therapy and combinations." Clin Exp Dermatol **26**(4): 356-61.
- Van de Kerkhof, P. C. and W. H. Vissers (2004). "Established treatments of psoriasis." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **3**(2): 145-56.
- Van den Brule, A. J., C. J. Meijer, et al. (1990). "Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **28**(12): 2739-43.
- Van Weelden, H., van der Leun, J.C. (1984). "Improving the effectiveness of phototherapy for psoriasis." Br J Dermatol **111**: 484.
- Viviano, E., L. Giovannelli, et al. (2007). "Human papillomavirus is commonly present in psoriatic skin and normal skin samples from healthy subjects." J Dermatol Sci **45**(2): 141-3.
- Weinstein, G. D. (1996). "Safety, efficacy and duration of therapeutic effect of tazarotene used in the treatment of plaque psoriasis." Br J Dermatol **135 Suppl 49**: 32-6.
- Weissenborn, S. J., R. Hopfl, et al. (1999). "High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA." J Invest Dermatol **113**(1): 122-6.
- Wolf, P., H. Seidl, et al. (2004). "Increased prevalence of human papillomavirus in hairs plucked from patients with psoriasis treated with psoralen-UV-A." Arch Dermatol **140**(3): 317-24.
- Yamauchi, P. S., D. Rizk, et al. (2004). "Retinoid therapy for psoriasis." Dermatol Clin **22**(4): 467-76, x.
- Zaravinos, A., I. N. Mamas, et al. (2009). "Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV)." Int J Biol Markers **24**(4): 215-22.
- Zargari, O. (2006). "The prevalence and significance of fissured tongue and geographical tongue in psoriatic patients." Clin Exp Dermatol **31**(2): 192-5.

